

微生物菌种高通量筛选技术与装置

华东理工大学

国家生化工程技术研究中心(上海)

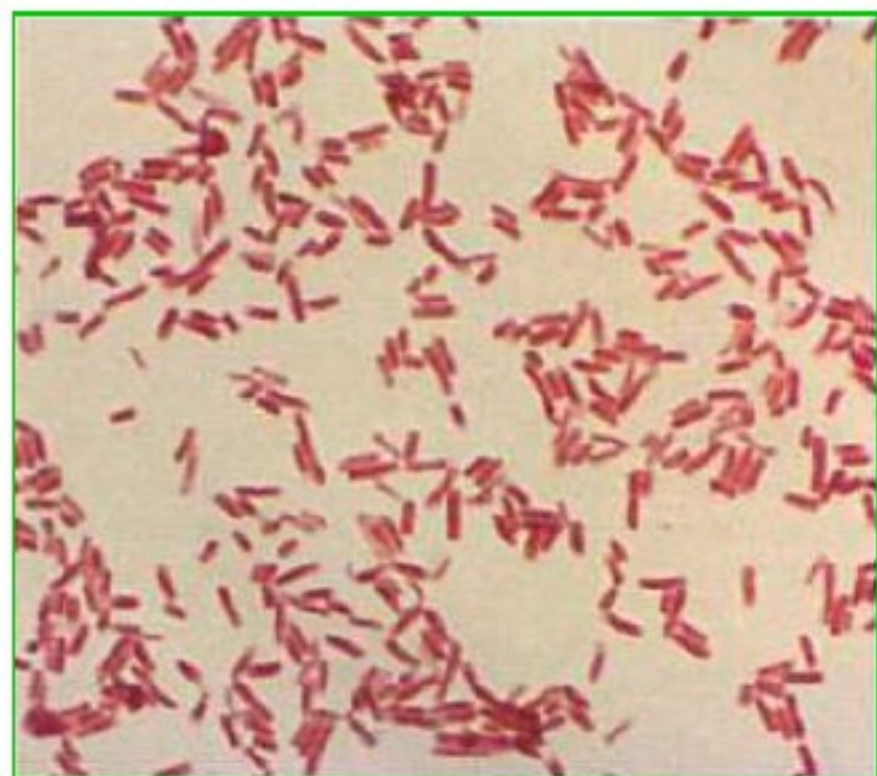
王永红

2011.11.24

- **高通量筛选在微生物育种中的重要意义**
- 菌种高通量筛选技术与装备国际进展
- 高通量筛选技术应用示范

高通量筛选在微生物育种中的重要意义

➤ 菌种发酵水平是企业产品市场竞争力的体现



- 1、菌种是发酵技术的源头
- 2、菌种是发酵技术的核心之核心
- 3、菌种提高不增加设备材料投入

青霉素：5万——12万 u/ml（国内）
8万——20万 u/ml（国外）

红霉素：5000——8000/10000 u/ml（国内）
10000——15000 u/ml（国外）

阿维菌素：4000——8400 u/ml（国内）
10000 u/ml 以上（国外）

高通量筛选在微生物育种中的重要意义

- 育种工作中两大任务：**突变**与**筛选**

变异菌种库	筛选目标株
自然选育 人工诱变 推理选育 杂交育种 基因工程 代谢工程 各种组学 系统生物学 合成生物学	特异性模型 筛选量



突变仅是前提
筛选才是关键

高通量筛选在微生物育种中的重要意义

➤ 我国现有菌种筛选仪器装备与技术国际相比存在巨大差距

我国： 传统方法，筛选方式半个世纪没有明显改进

国际： 高通量筛选技术(High throughput screening, HTS)

Traditional screening	High throughput screening
Flask/tube (single)	Microtiter plate (12、24、48、96、384、1536)
Volume (10-50 ml)	Volume (10-500 μ l)
Screen 20-50/week/lab	Screen 1000-10000/week/lab



Manual	Automatic
Laborious	Laborsaving
Series	Parallel



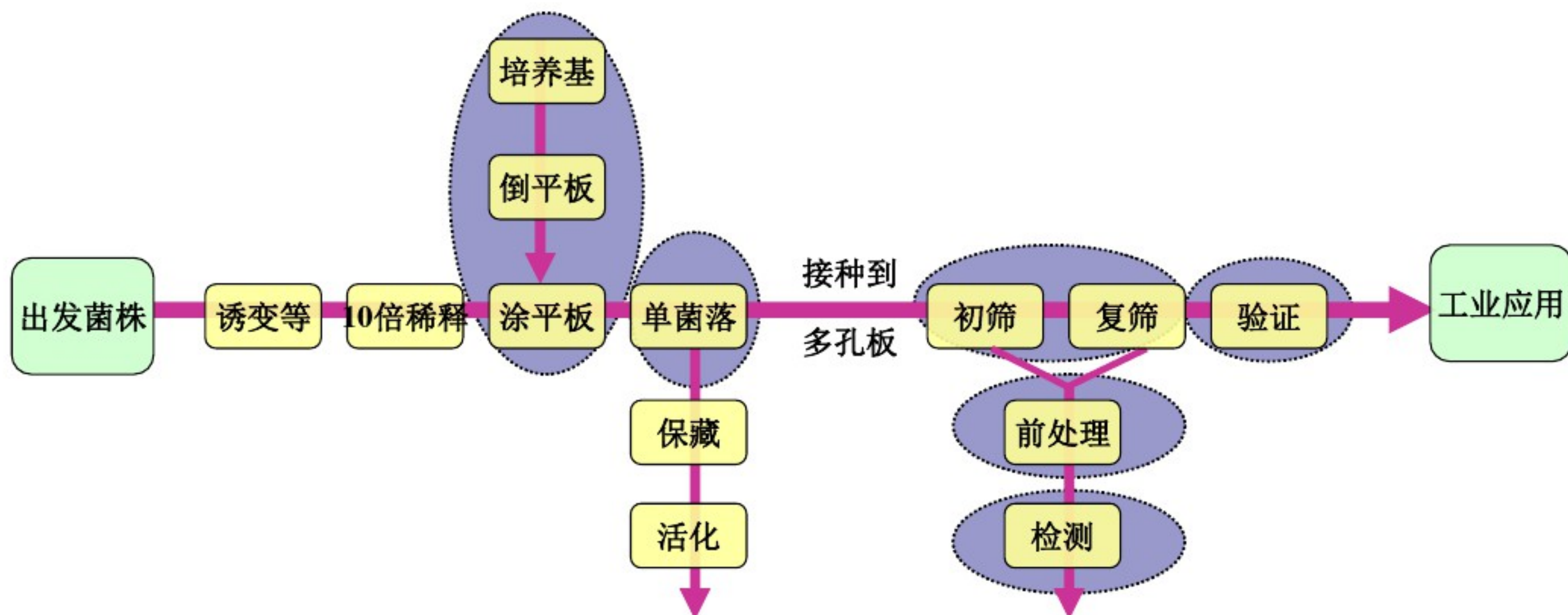
- 高通量筛选在微生物育种中的重要意义
- **菌种高通量筛选技术与装备国际进展**
- 高通量筛选技术应用示范

高通量筛选技术的起源

- 1929, 1940s-1950s
- Pfizer公司：土霉素的发现
 - 56名科学家、10万份土样、历时1年
 - 25%市场
- 1984年，Pfizer提出Automation Project.
- 1990年，在Nagoya, Japan实施
 - 1万株份/周

菌种高通量筛选技术与装备国际进展

- 微生物菌种筛选一般流程
- 概率事件
- 通量限制步骤

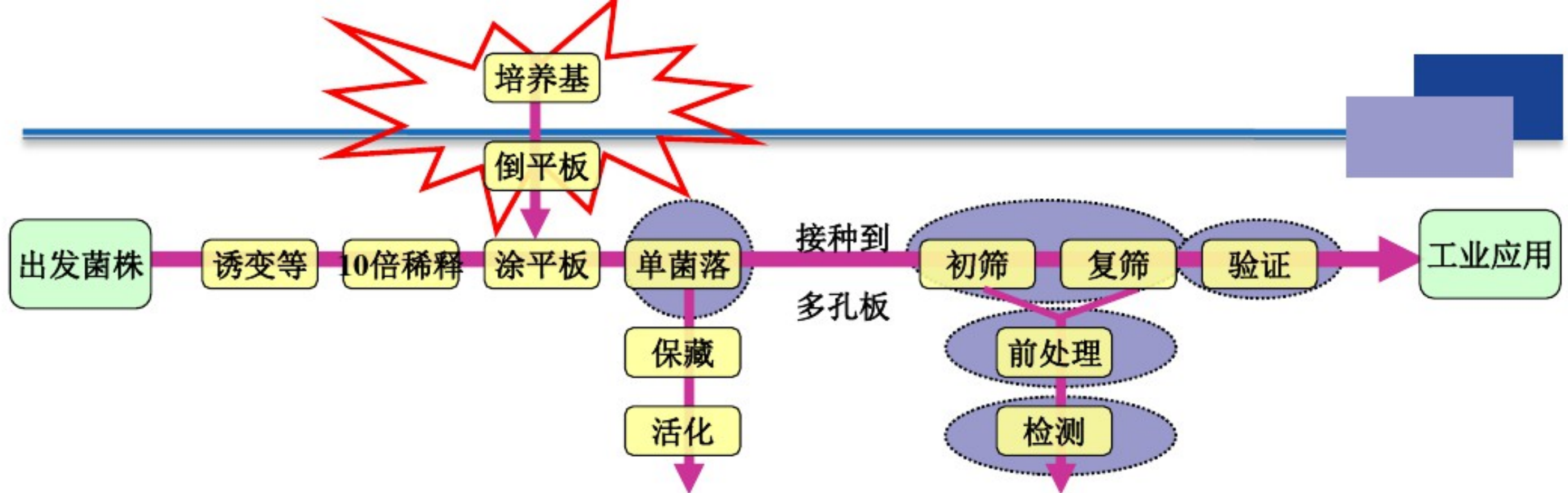


菌种高通量筛选技术与装备国际进展

➤ 微生物菌种筛选仪器装备发展趋势：

自动化、微型化、高通量

- 培养基灭菌、分装；倒平板；挑取单菌落、接种；培养；目的产物抽提；测定；数据收集处理等过程
- 单元自动化与系统集成自动化（**通量匹配**）



Filling Unit

分装速率: **400 - 1200 dishes/h**

分装量: 4 - 45 ml/0.5 - 0.6 sec

平动规格: 直径92 - 98 mm可调

高度15 - 21 mm可调

灭菌方式: 253.7 nm 紫外线灭菌

尺寸重量: 45 cm(L)*30 cm(D)*61cm(H), 15 kg

★Stacking Unit

堆叠速率: 可调, 与输送机自动配合。

堆叠高度: 2 - 15板平皿, 可调

堆叠桌面: 500' 500 mm可扩充

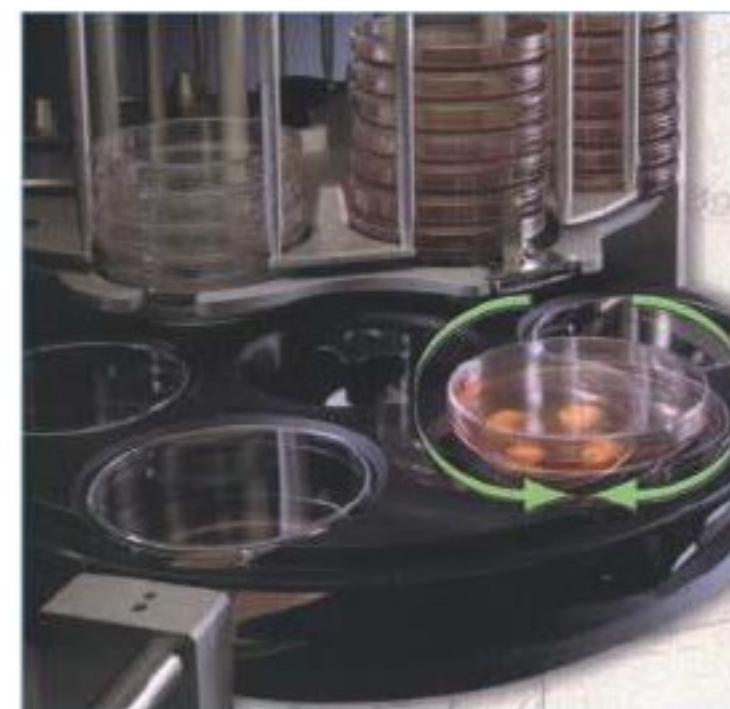
尺寸重量: 81cm(L)*49cm(D)*45cm(H), 13kg



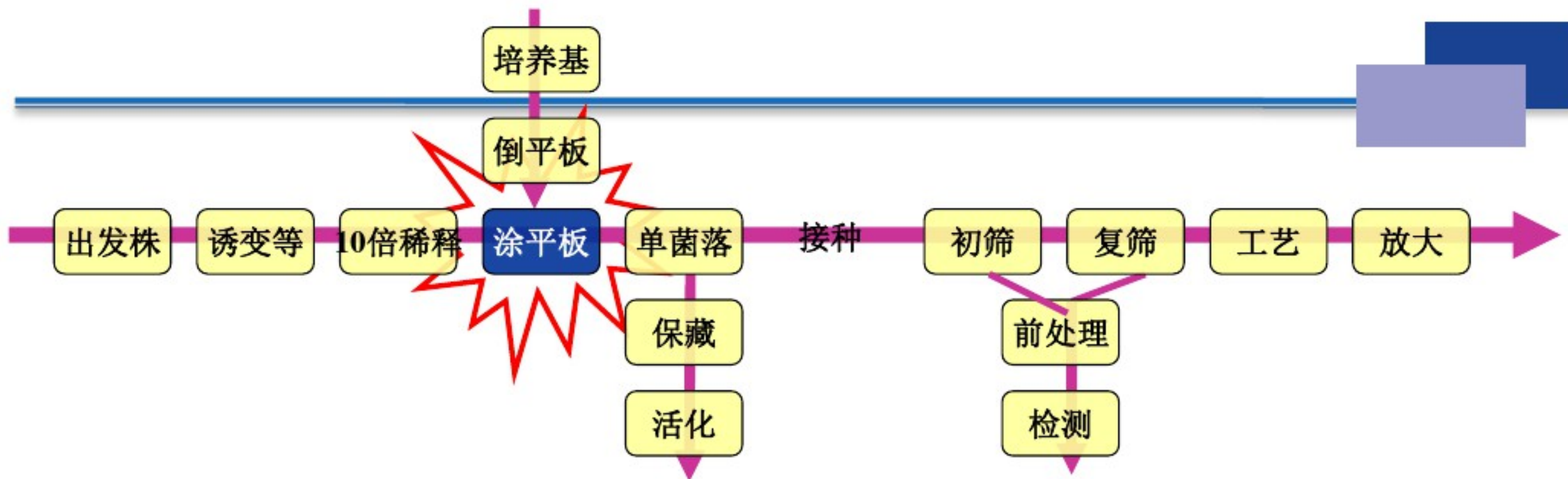
自动灭菌培养基制备机



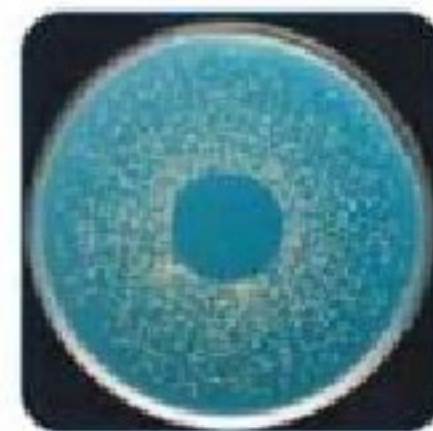
全自动培养基分装系统

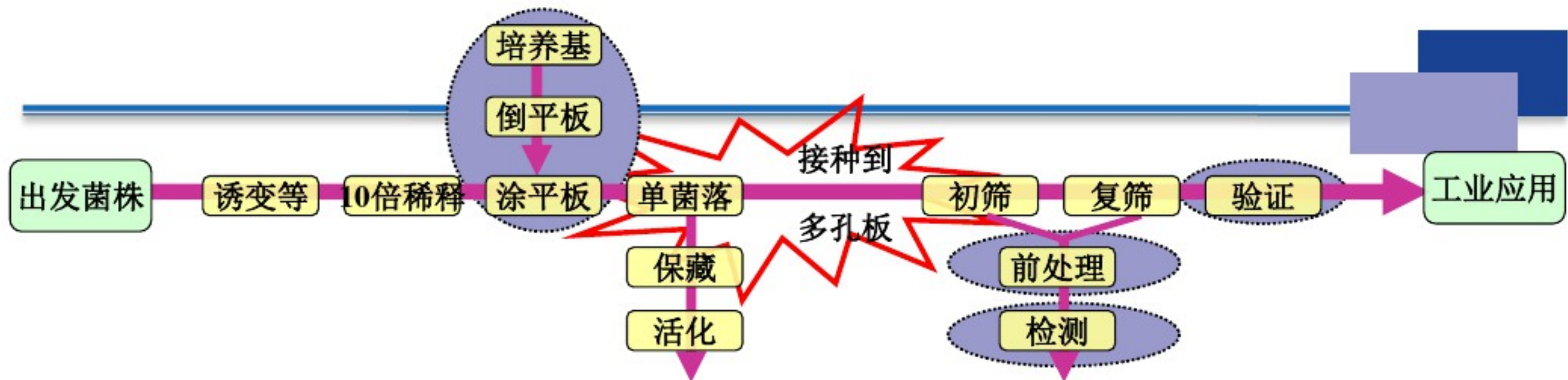


750皿/小时

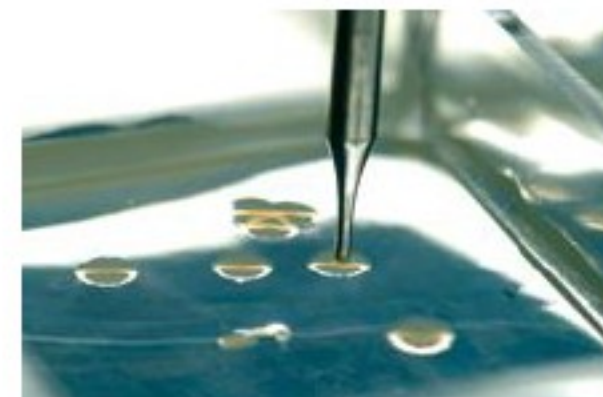
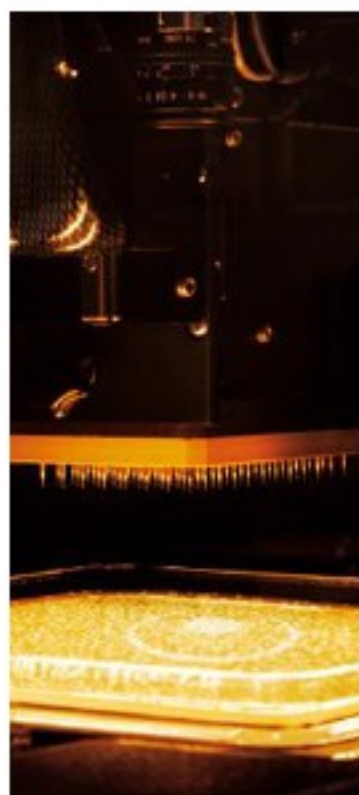


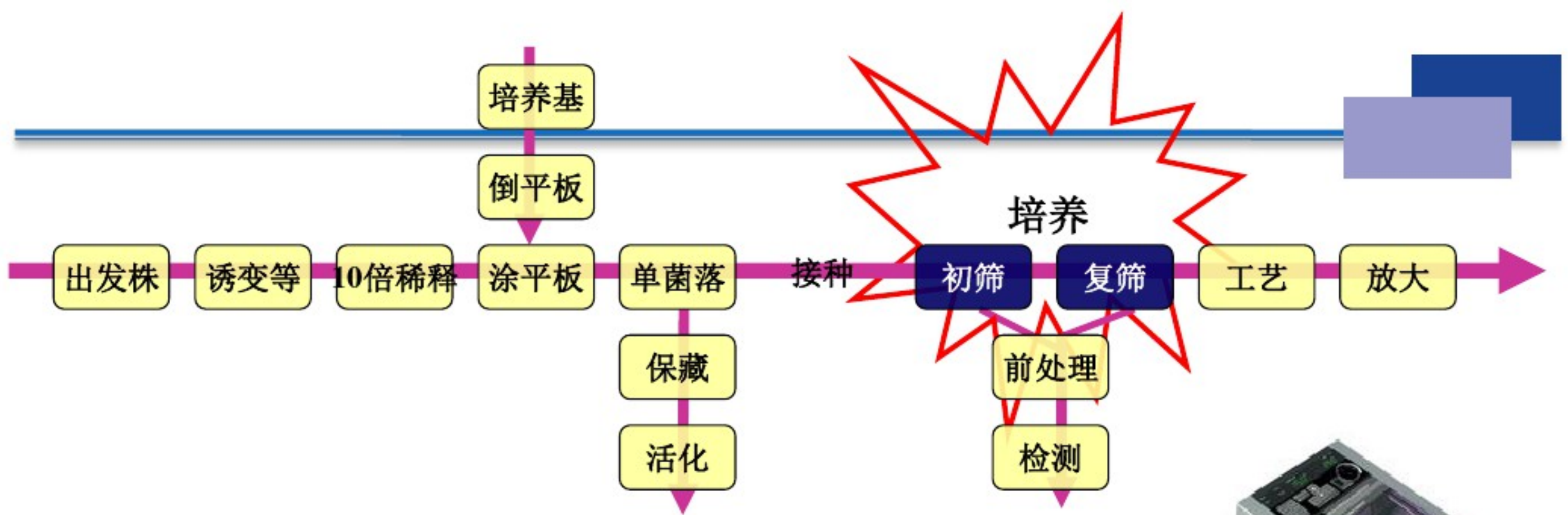
自动细菌平板稀释仪

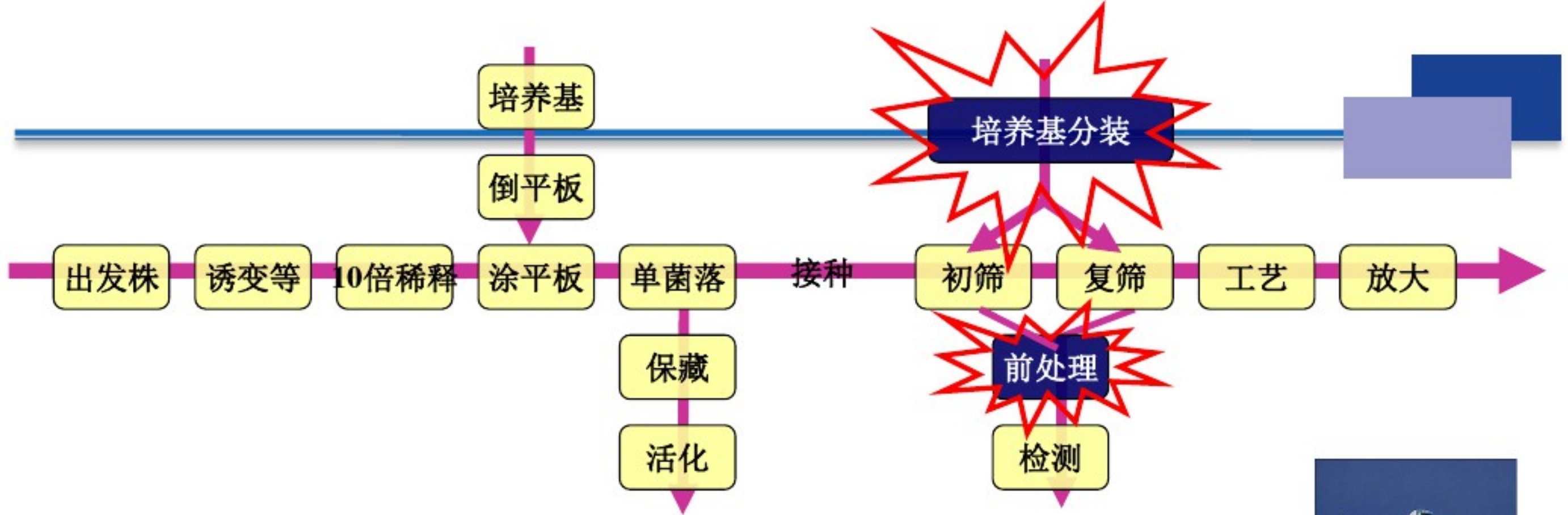




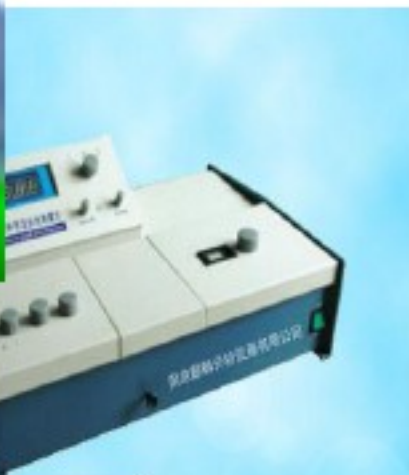
4600个克隆/小时



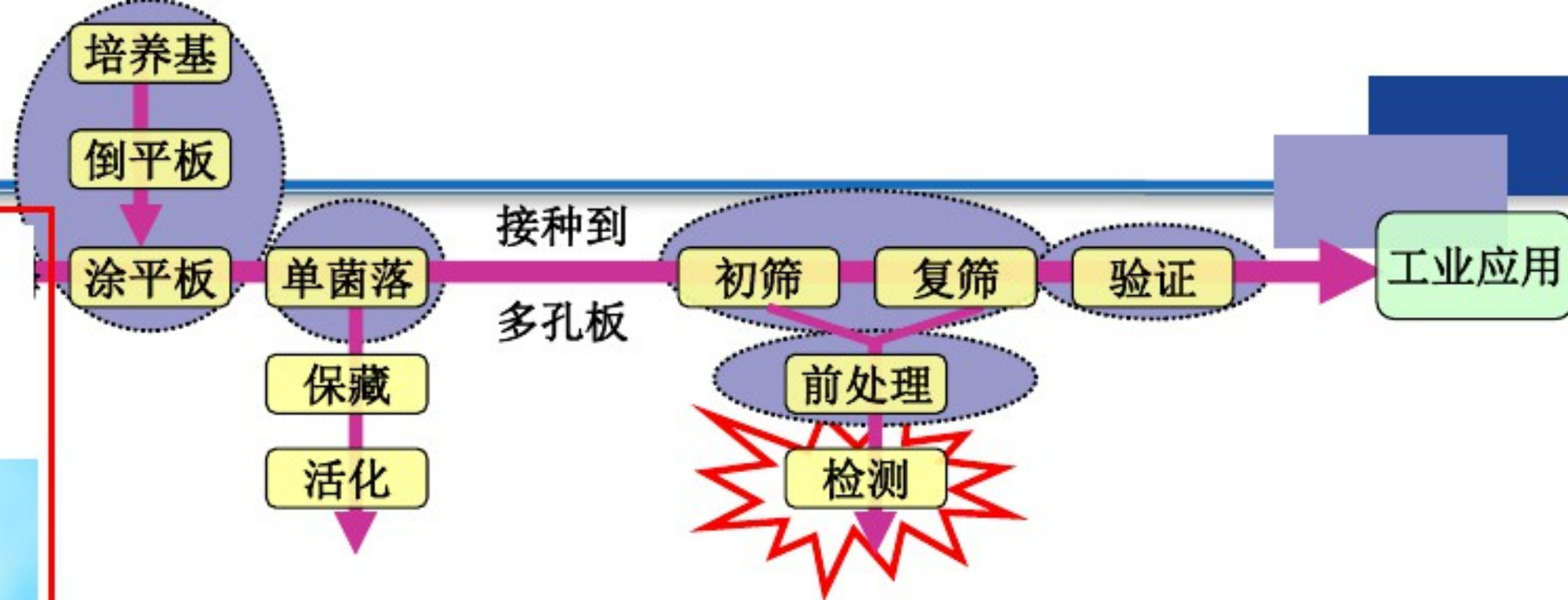




传统方法



可见分光光



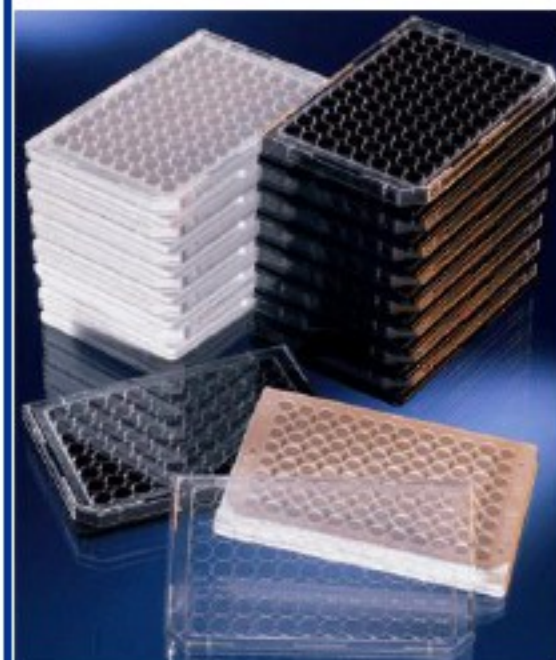
传统方法:

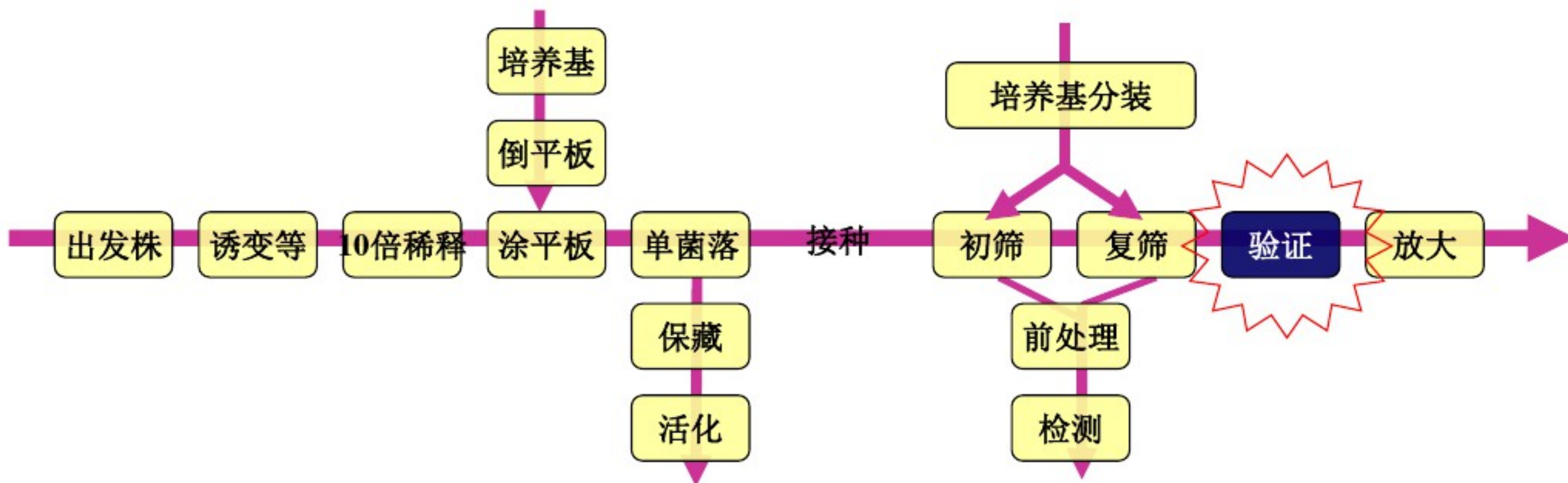
1-2/min (分光光度计)

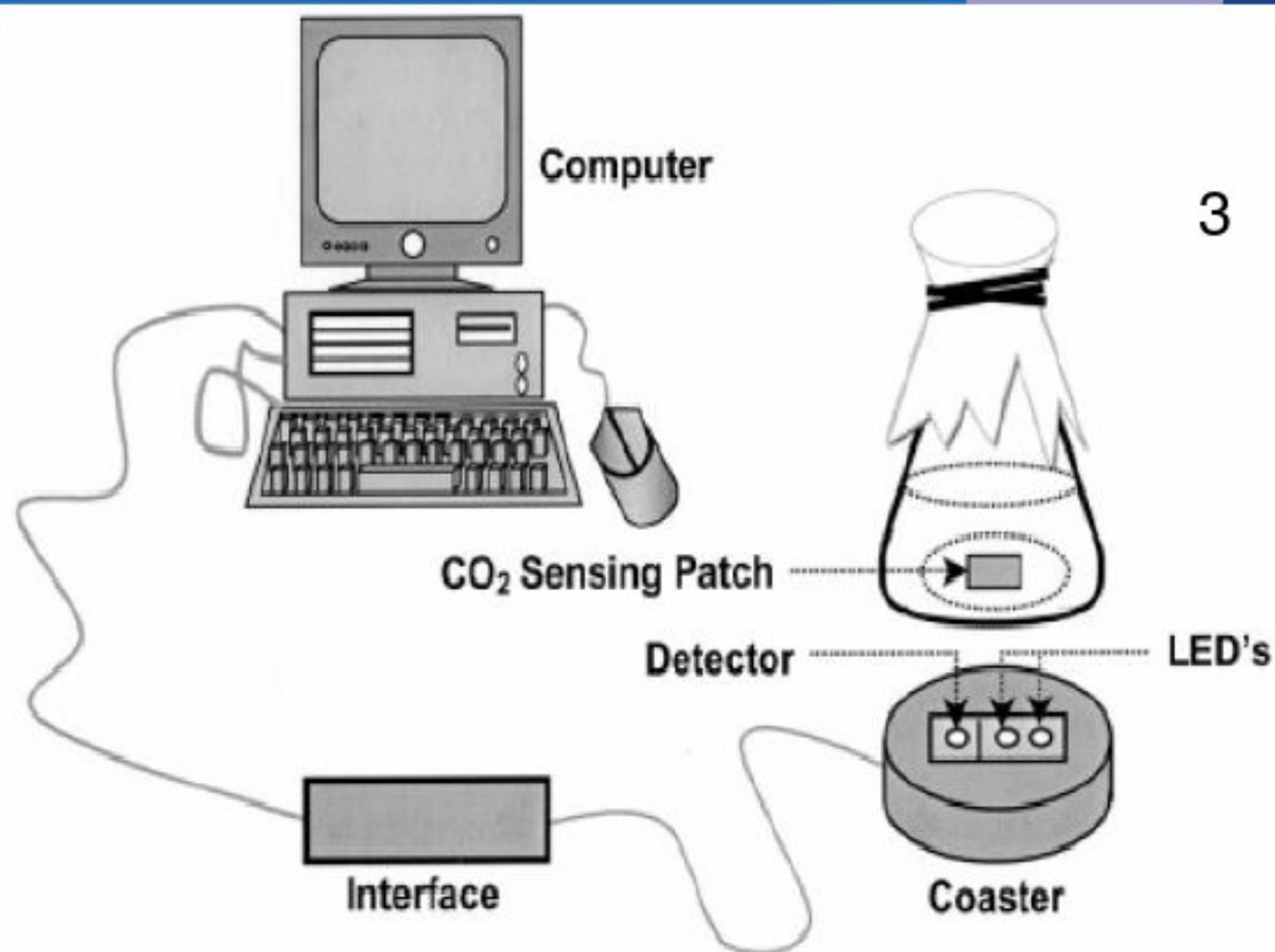
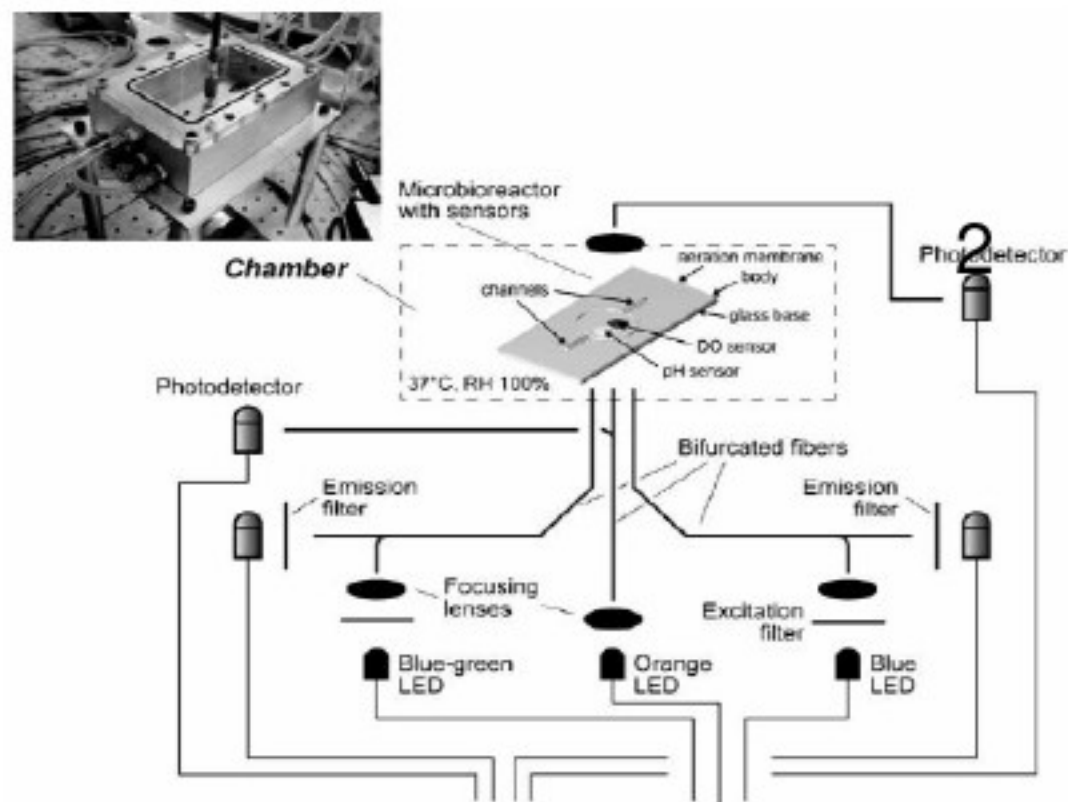
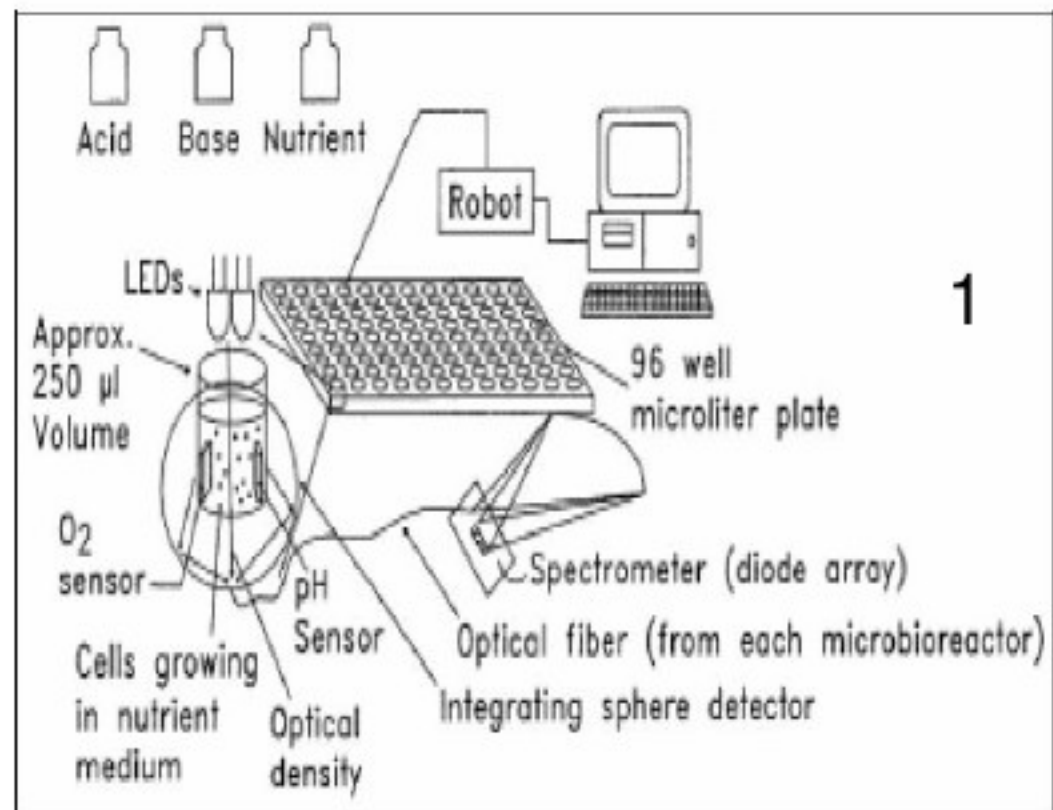
1/15-30min (HPLC)

高通量方法:

96、384、1536/min







1 微孔板式反应器

2 微流控式芯片实验室

3 摇瓶形式的微型反应器

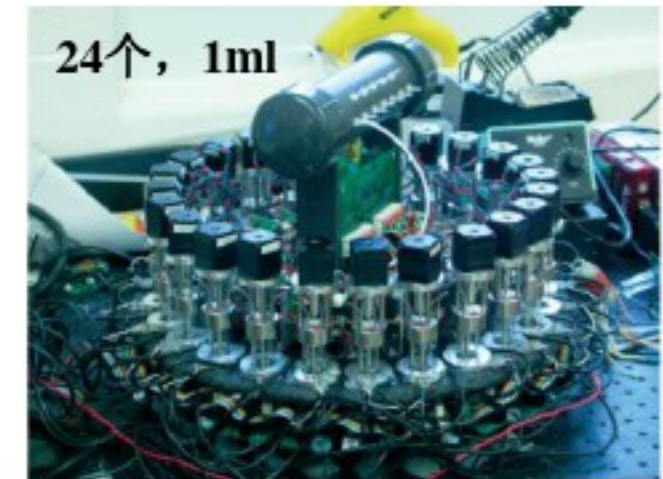
12个, 30ml



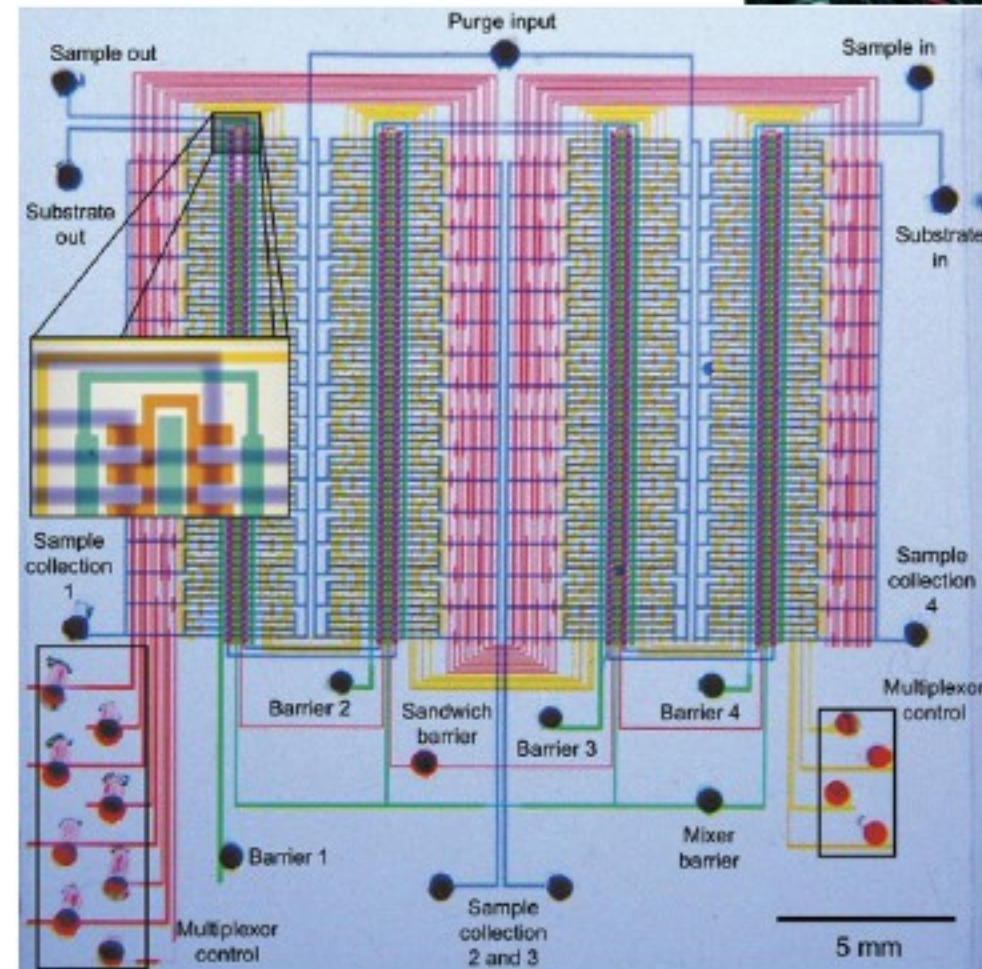
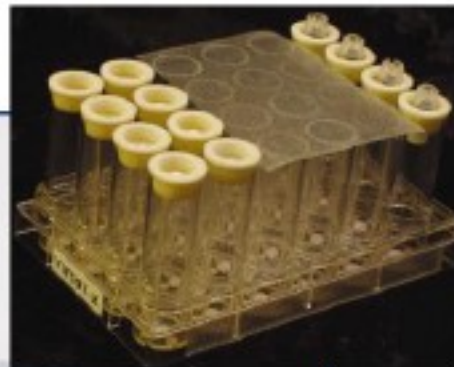
Individual Mini Stirred-Tank

多通道多参数 微型反应器

24个, 1ml

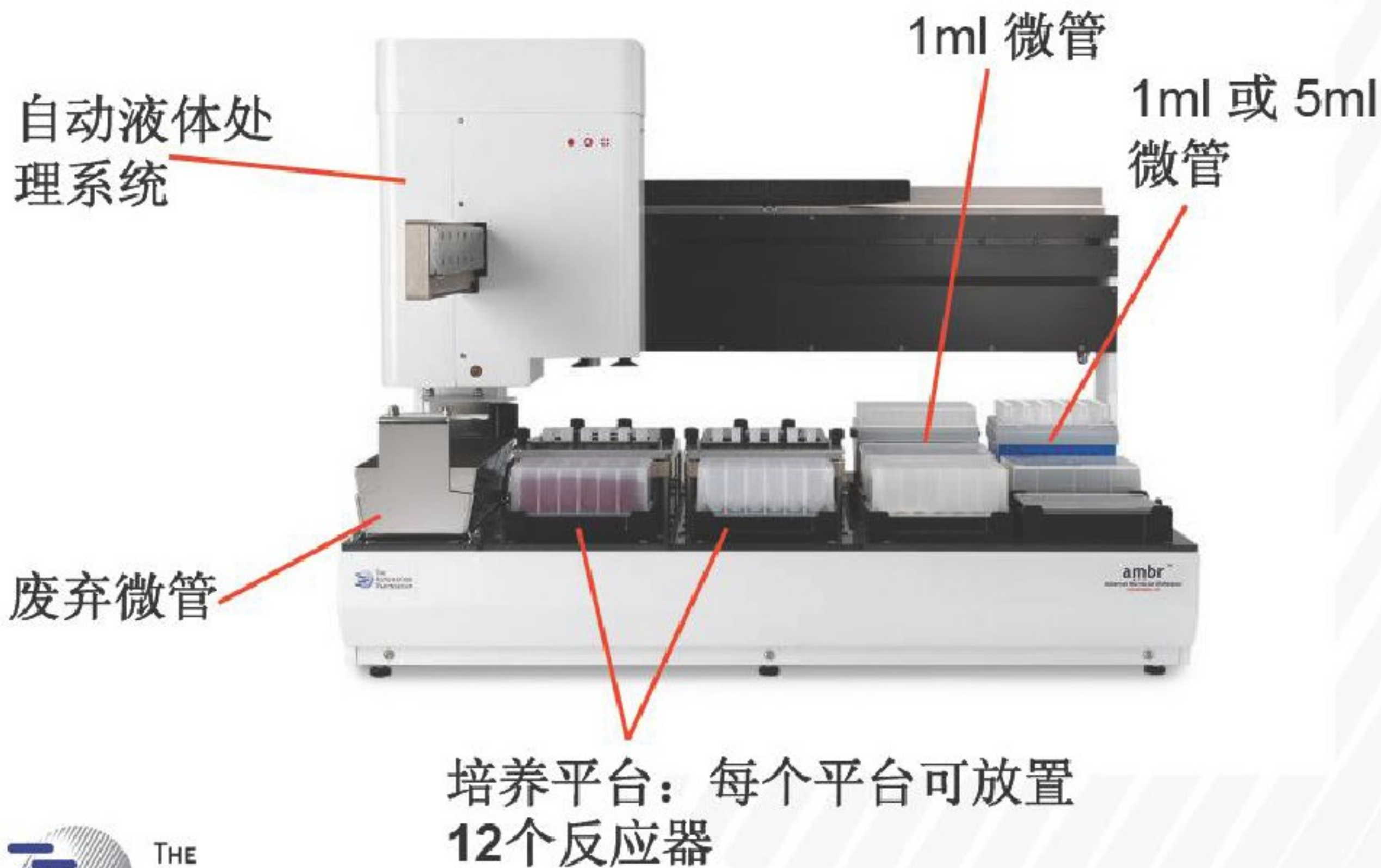


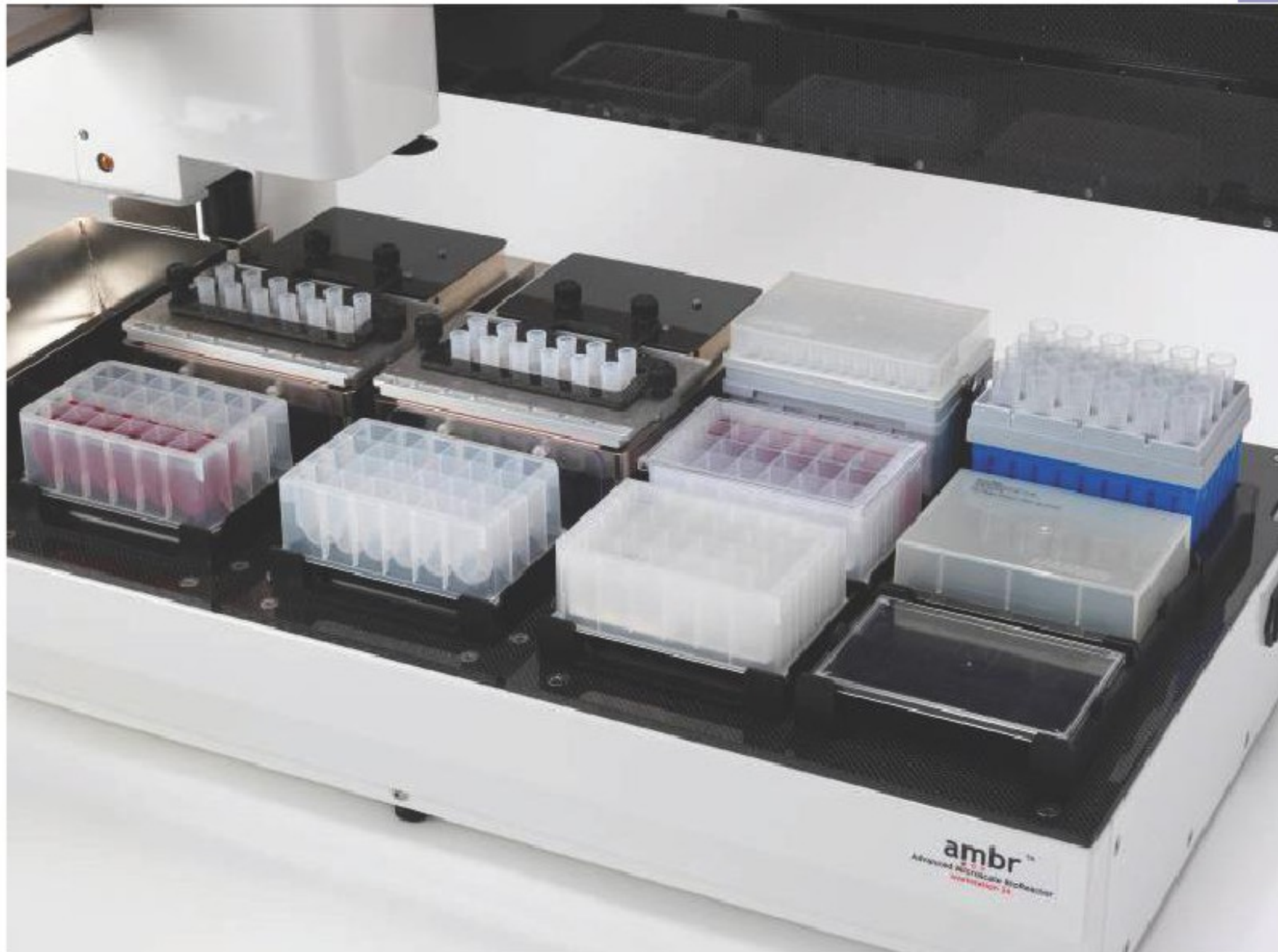
24个, 5ml

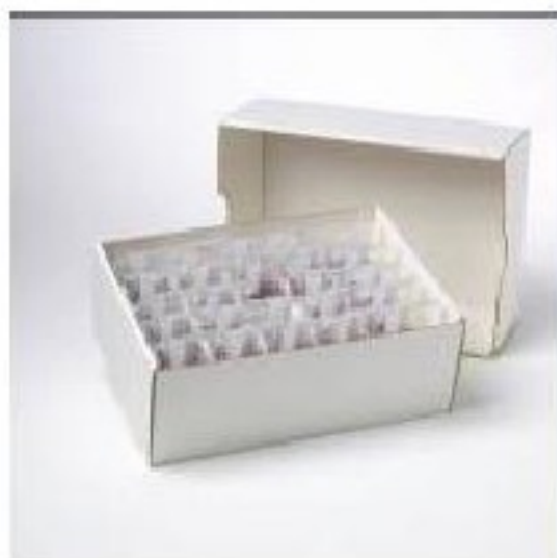


2056 valves , 256 compartments
containing bacterial expressing
an enzyme

动物细胞培养用微型反应器







罐体盖
专为机器开盖和更换
设计

进气孔过滤器

进气管(可选)

搅拌桨



DO 探头

pH 探头



THE
AUTOMATION
PARTNERSHIP



小巧：8 个反应器不到 1 平方米=大大节省空间！

系统集成自动化：四个层次



左图 $4.9 \times 2.3 \times 2.2$ m，整个箱体有温湿度控制，箱体内部，条形码阅读器、盖板站、封板器、液体处理装置、摇床、光度计、离心机、冷藏室等。平行地实现样品准备、运行、监控768个（16个48孔板）。

Orbitor工作站

■ 重量轻

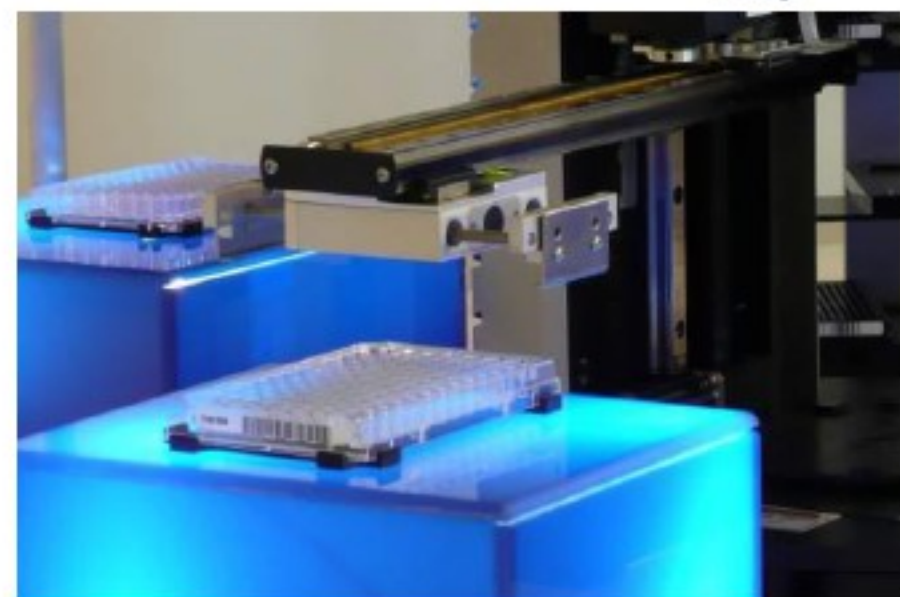
- only 55 lbs. 只有25公斤

■ 高可靠性

- Collision detection & recovery 冲突检测与恢复
- Plate sensing in the gripper 微孔板传感器
- Servo gripper – does not drop a plate when the power goes out! 伺服抓板手-即使停电也不会让一个板子掉落

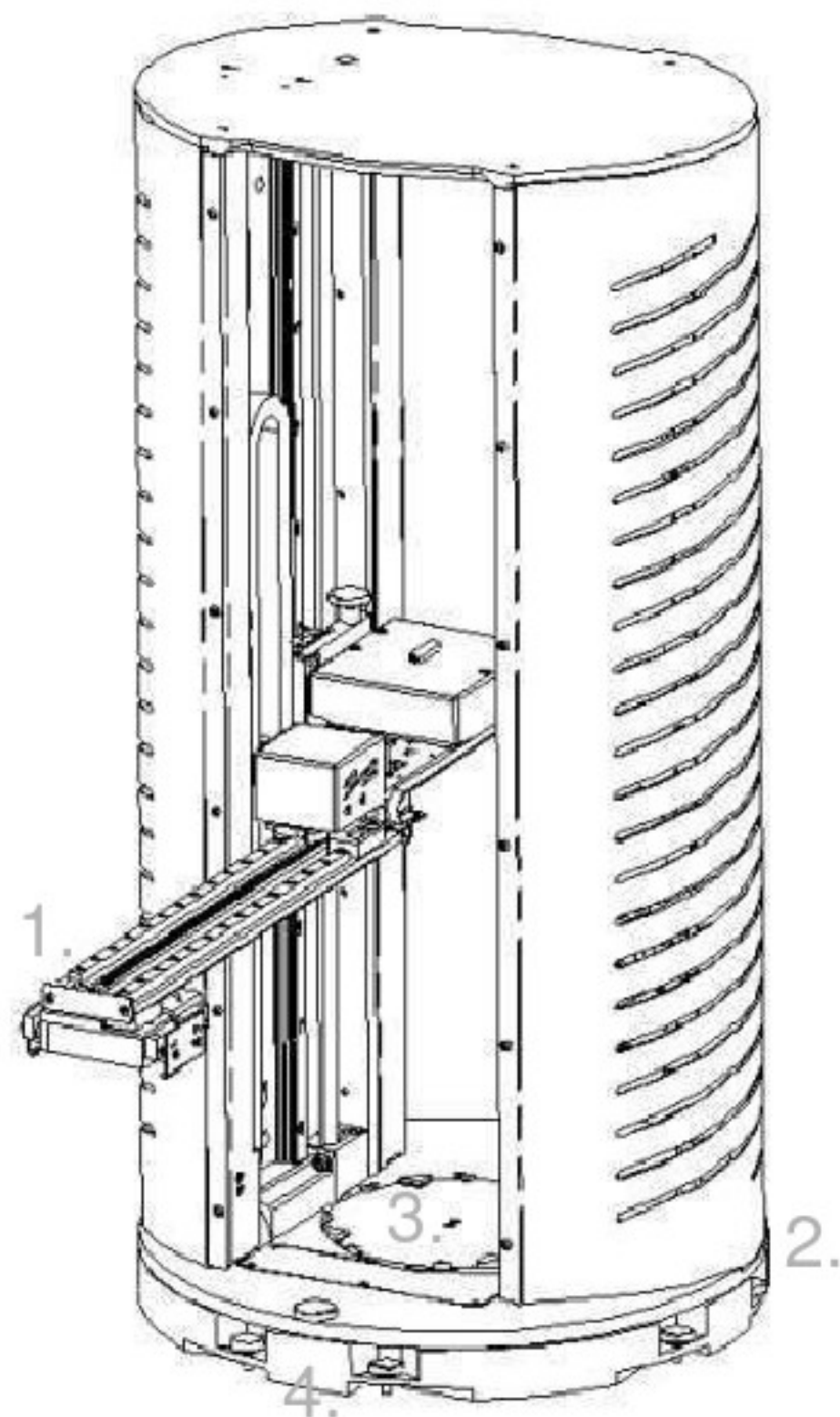
■ 运送一块板子只需4秒钟

- Bi-directional telescoping arm 双向伸缩手
- Unlimited 360° rotation 无限360度转动
 - No hard stops 无急停死角
- Motion blending 运动混合
 - smooth movements 平稳移动



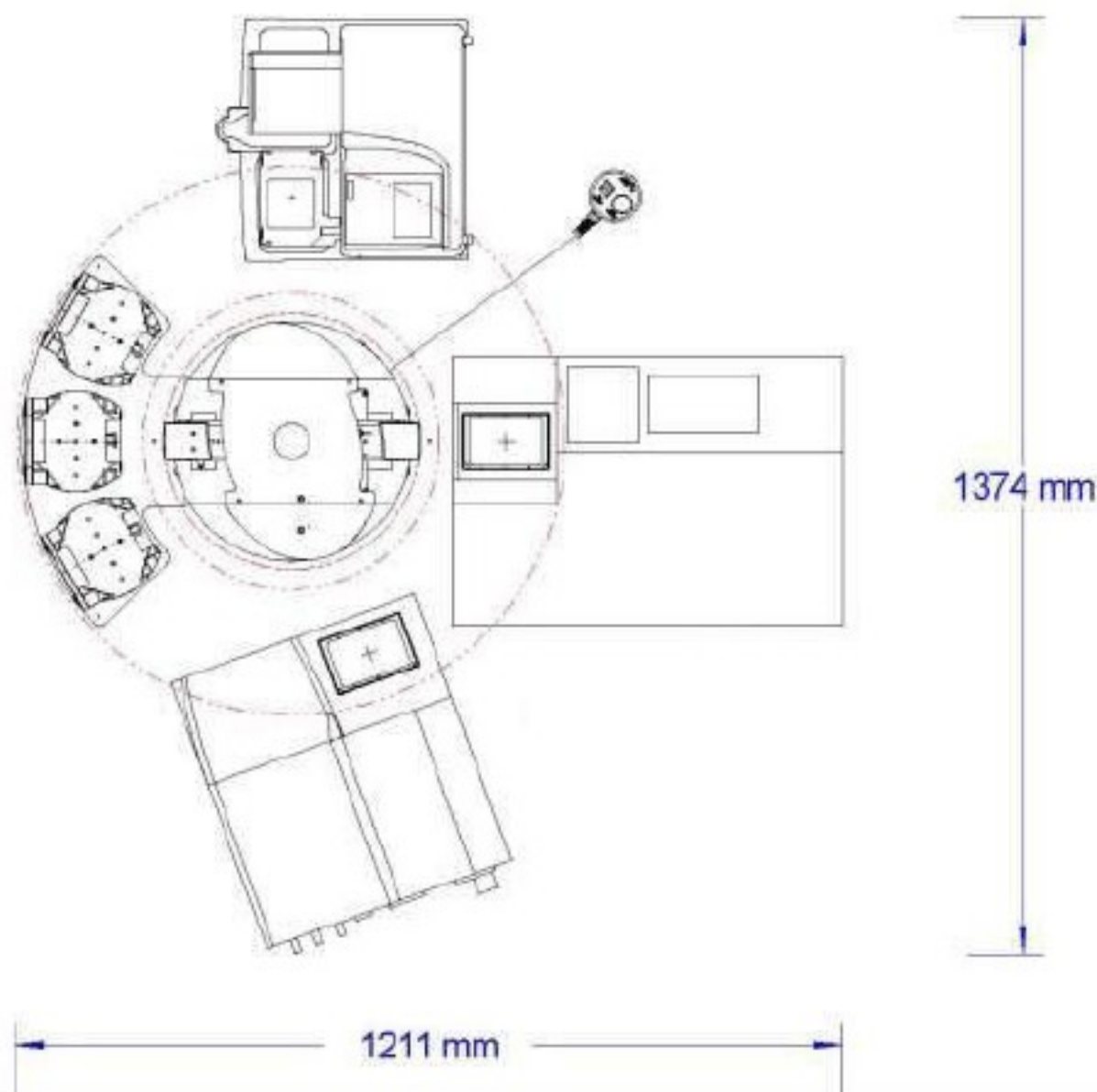
Orbitor结构剖解

1. Bi-directional telescoping arm 双向伸缩抓板手
2. Rotating base 旋转平台
3. Internal re-grip 内部固定装置
4. Hotel mount x4 板子堆栈*4



操作灵活性

- PC driven 微机控制
 - No controller required 无需其它控制装置
- Add-on storage capability 可搭配存储能力
- Small footprint 小的占地空间和轨迹
- Feed up to 4 instruments with ease 可连接4台仪器
- Fits within a wide variety of bio safety cabinets 适应多种型号的生物安全柜



- 高通量筛选在微生物育种中的重要意义
- 菌种高通量筛选技术国际进展
- **高通量筛选技术应用示范**

高通量筛选技术

微型化

高通量

标准化

Scale up



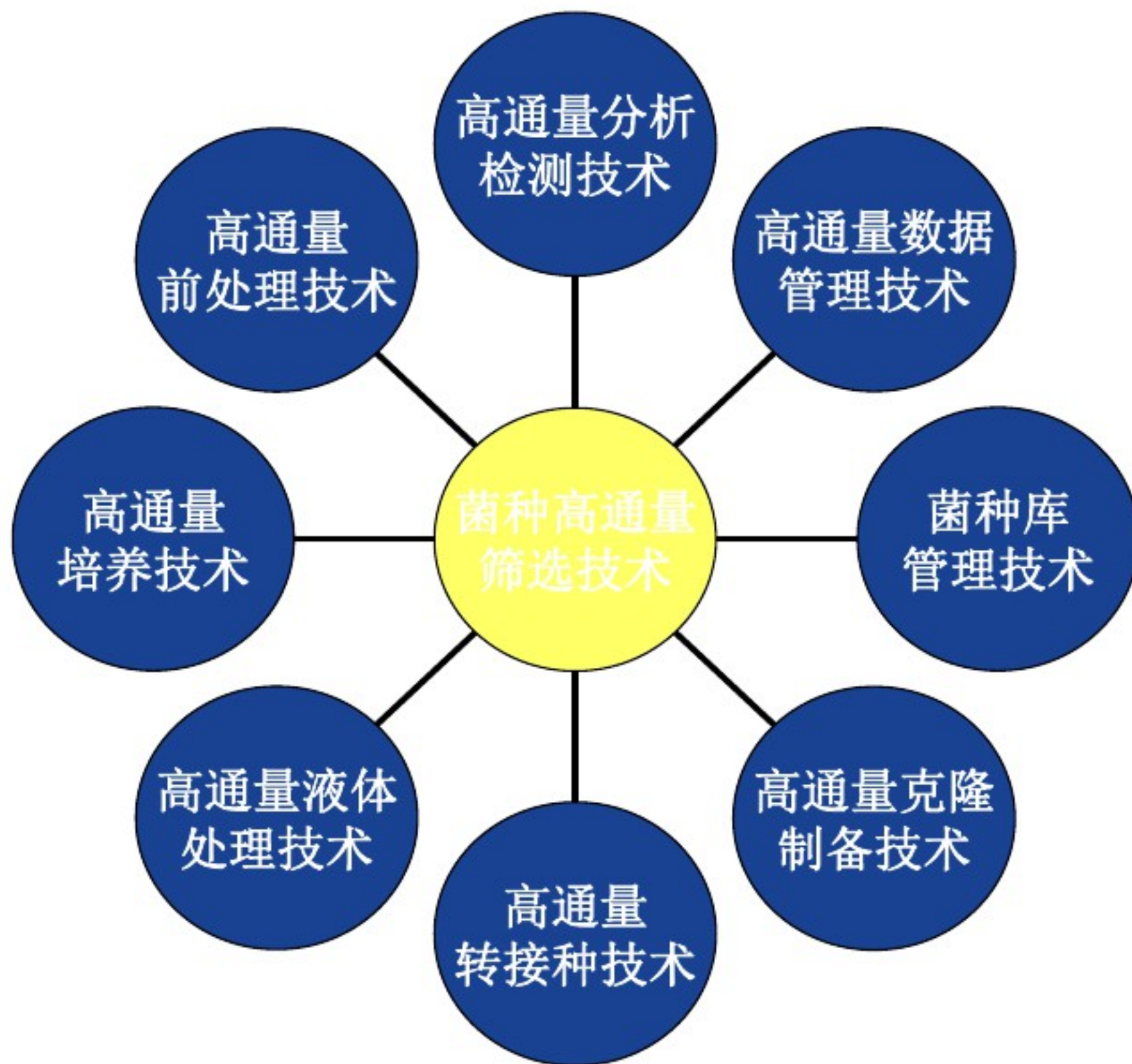
Scale down



对高通量筛选技术存在认识上的误区

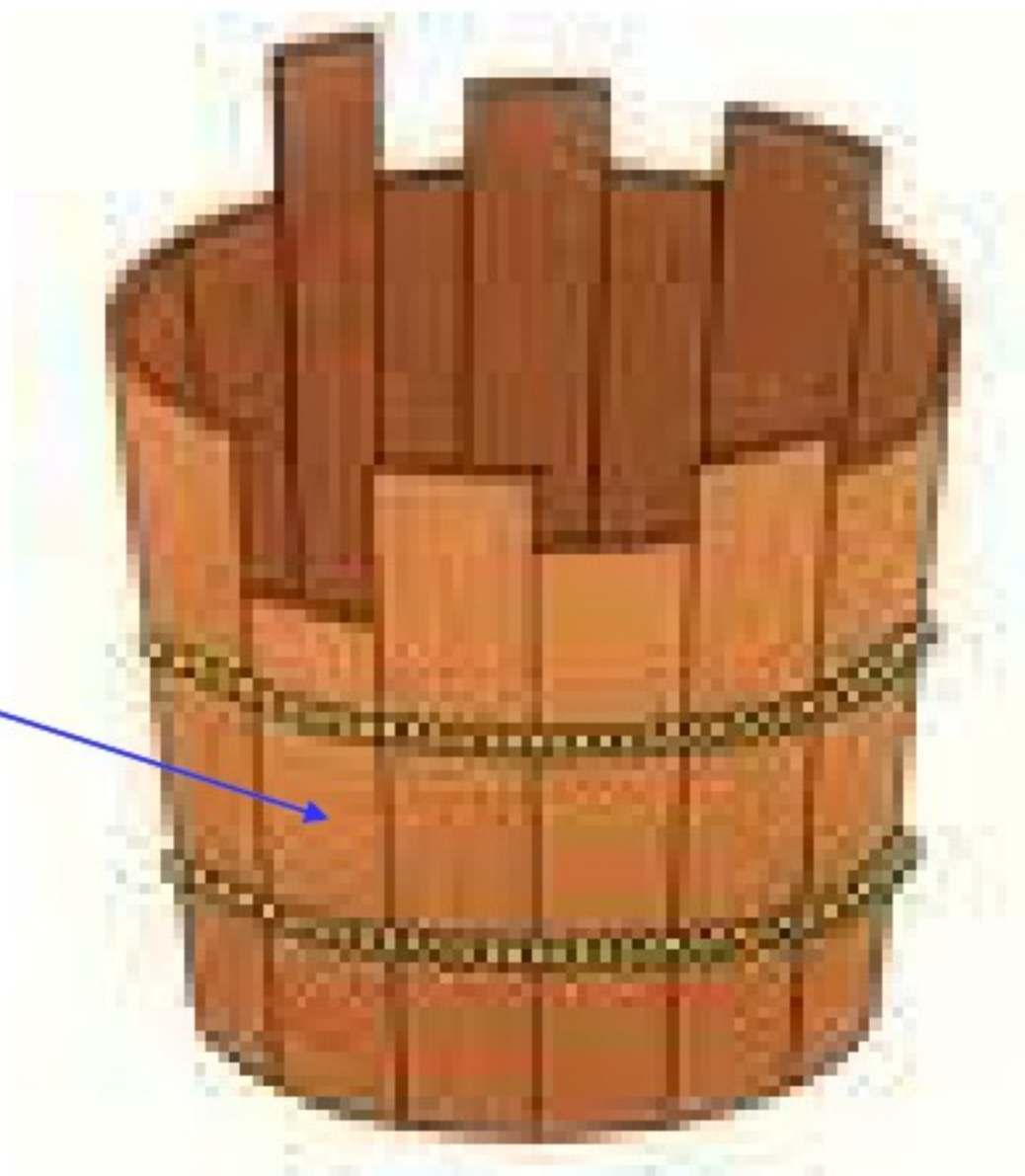
- 认为微型化只要按比例缩小即可，忽略参数相关性问题；对操作条件的平行性没有足够的认识
- 仅注重培养环节高通量，忽略其他步骤匹配和瓶颈的转移问题
- 对标准化重于最优化的认识不足
- 高通量筛选是提高成功几率的一种技术手段

菌种高通量筛选技术组成



菌种高通量筛选技术

菌种资源

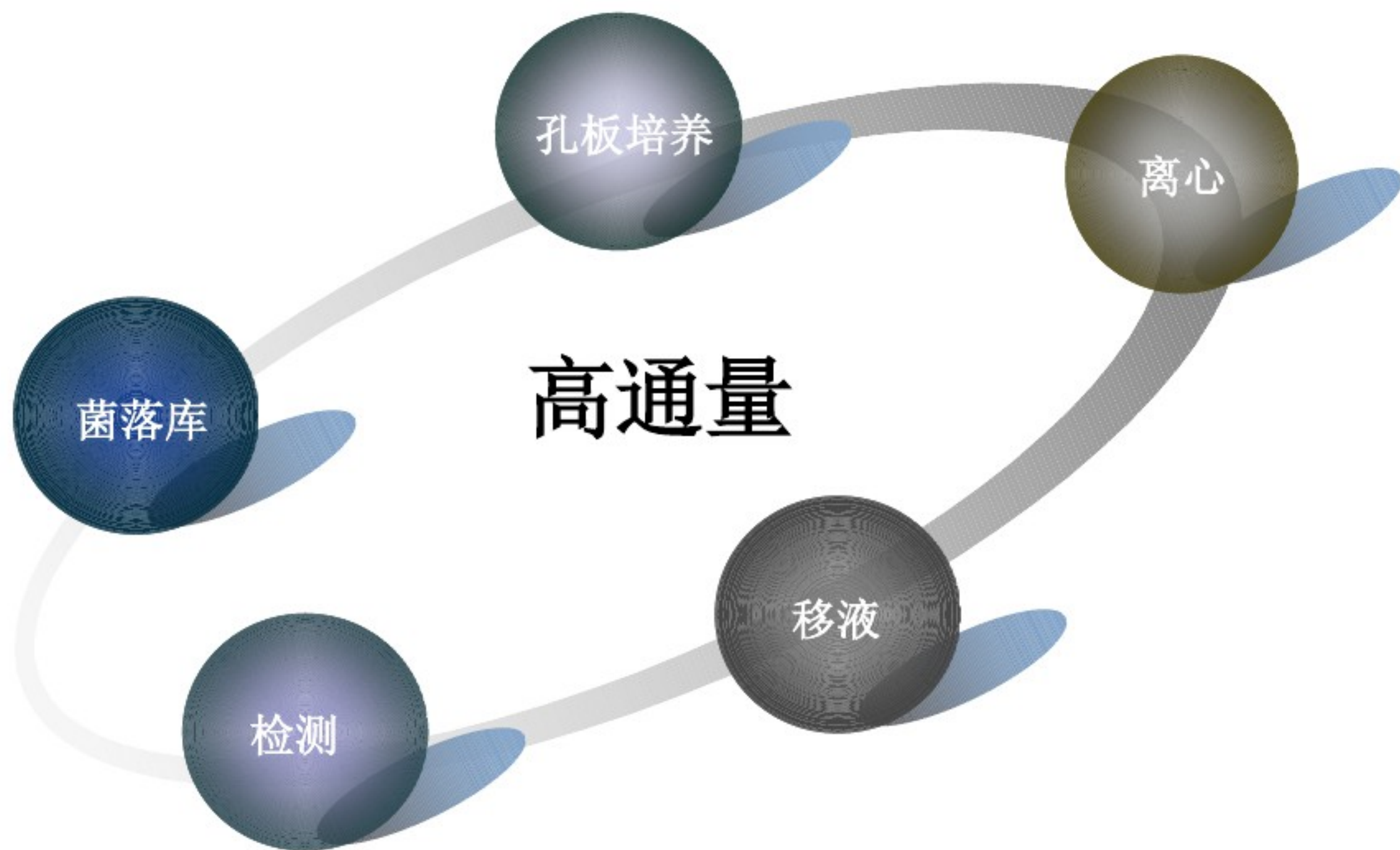


通量匹配

限制瓶颈在不断克服和转移

➡ 菌种高通量筛选技术是一整套高通量技术的有机整合和合理匹配

红霉素生产菌株的微型化培养及分析



- 就摇瓶与微孔板之间的生理发酵参数和动力学参数进行了研究，以证实微型化培养方法的可行性，为红霉素产生菌高通量筛选奠定了基础。

微型化培养-动力学参数比较

Biotechnol. Prog. 2002, 18, 821–830

2.1 氧气传递系数

	摇瓶	12孔微孔板
k_{La} (h^{-1})	105. 2	88. 4

Modeling of Mixing in 96-Well Microplates Observed with Fluorescence Indicators

Svenja Weiss,[†] Gernot T. John,^{†,‡} Ingo Klimant,^{§||} and Elmar Heinzle^{*,†}

Biochemical Engineering Institute, Saarland University, Im Stadtwald, Building 2, D-66123 Saarbrücken, Germany, and Institute of Analytical Chemistry, Chemo- & Biosensors, University of Regensburg, D-93053 Regensburg, Germany

Characterization of Gas–Liquid Mass Transfer Phenomena in Microtiter Plates

Robert Hermann, Mathias Lehmann, Jochen Büchs

Department of Biochemical Engineering, Aachen University of Technology, Sammelbau Biologie, Worringerweg 1, D-52056 Aachen, Germany; telephone: +49-(0)241-80 25546; fax: +49-(0)241-80 22 265; e-mail: buechs@biolt.rwth-aachen.de

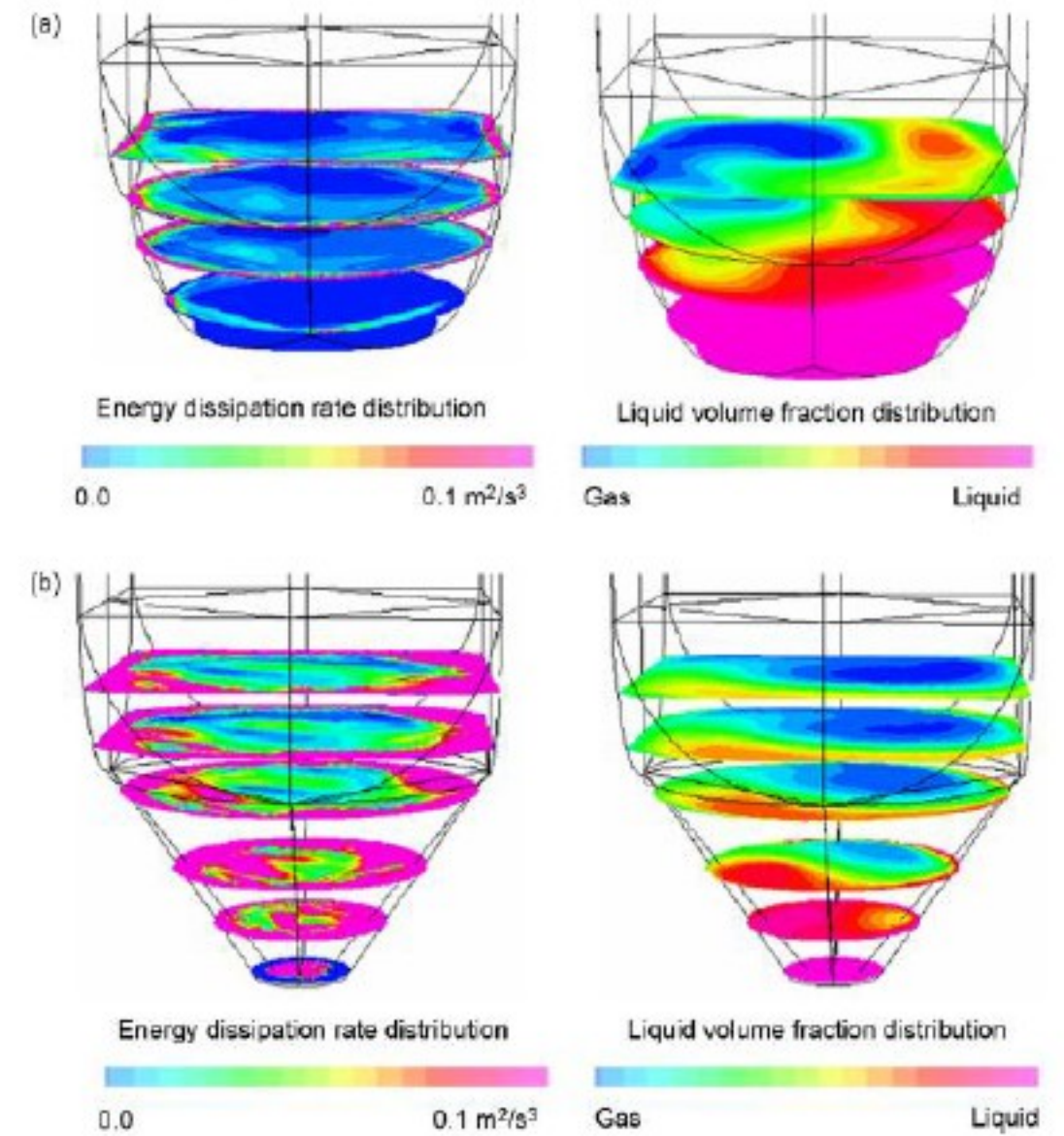
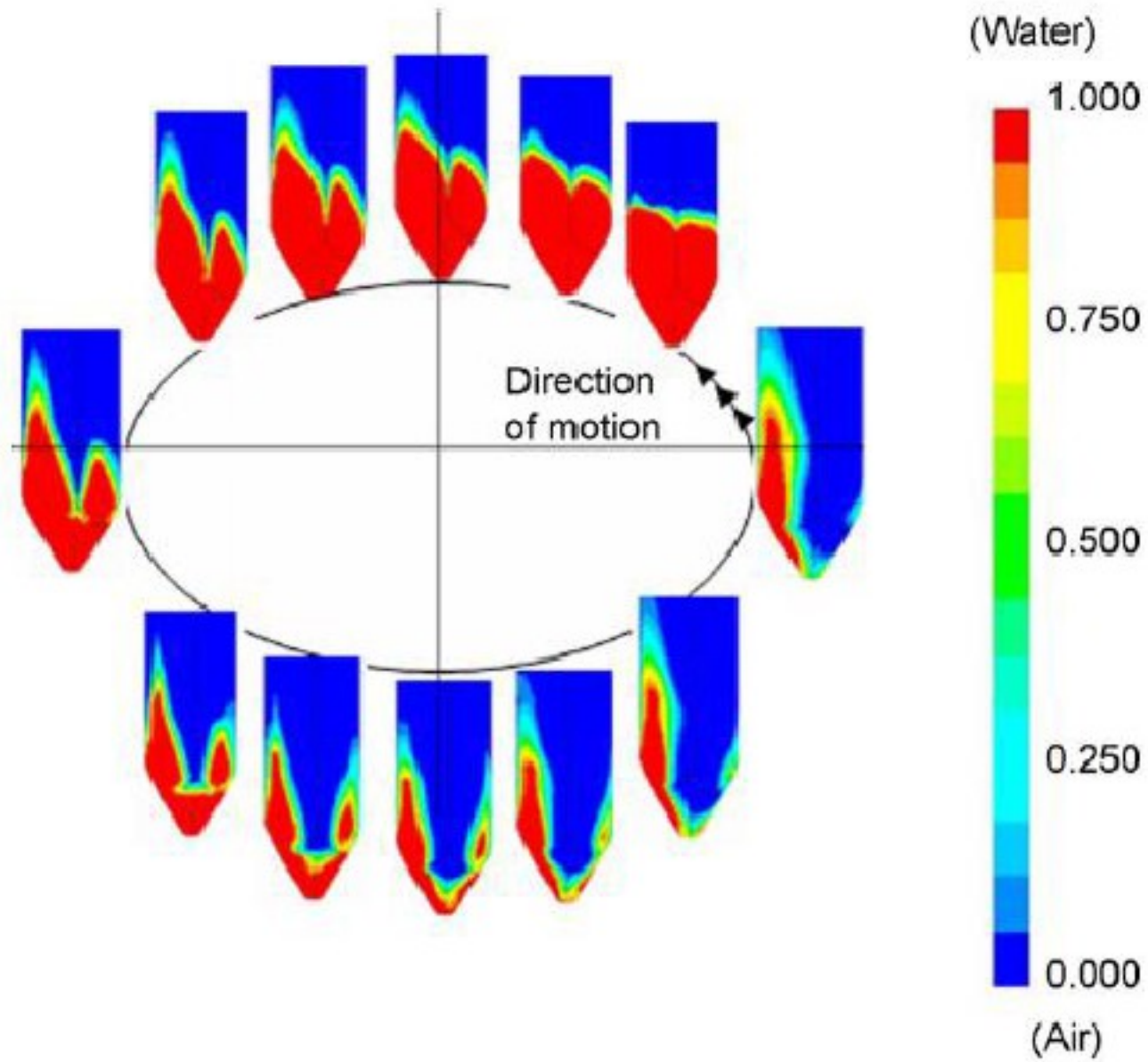
Received 27 March 2002; accepted 11 June 2002

DOI:10.1002/bit.10456

2.2 物料混合

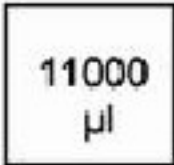
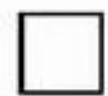
	t1	t2	t3	t4	t5	t6
摇瓶	30"	31" 28	29" 20	34" 22	37"	28" 30
12孔板 (2.5ml)	8" 97	8" 61	8" 59	9" 11	9" 32	8" 87

流场特性



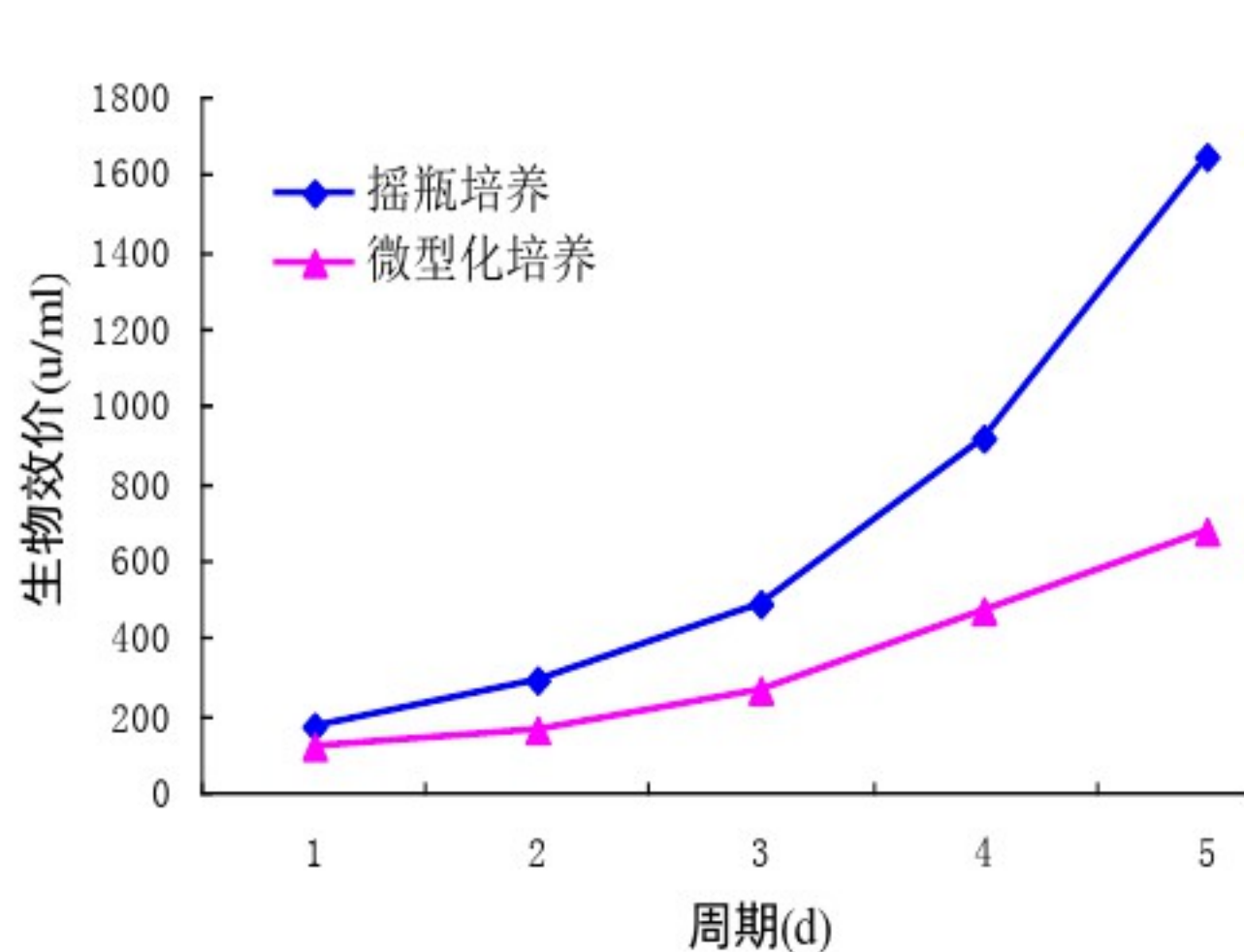
三、国家生化工程中心的高通量筛选工作基础

OTR 与混合

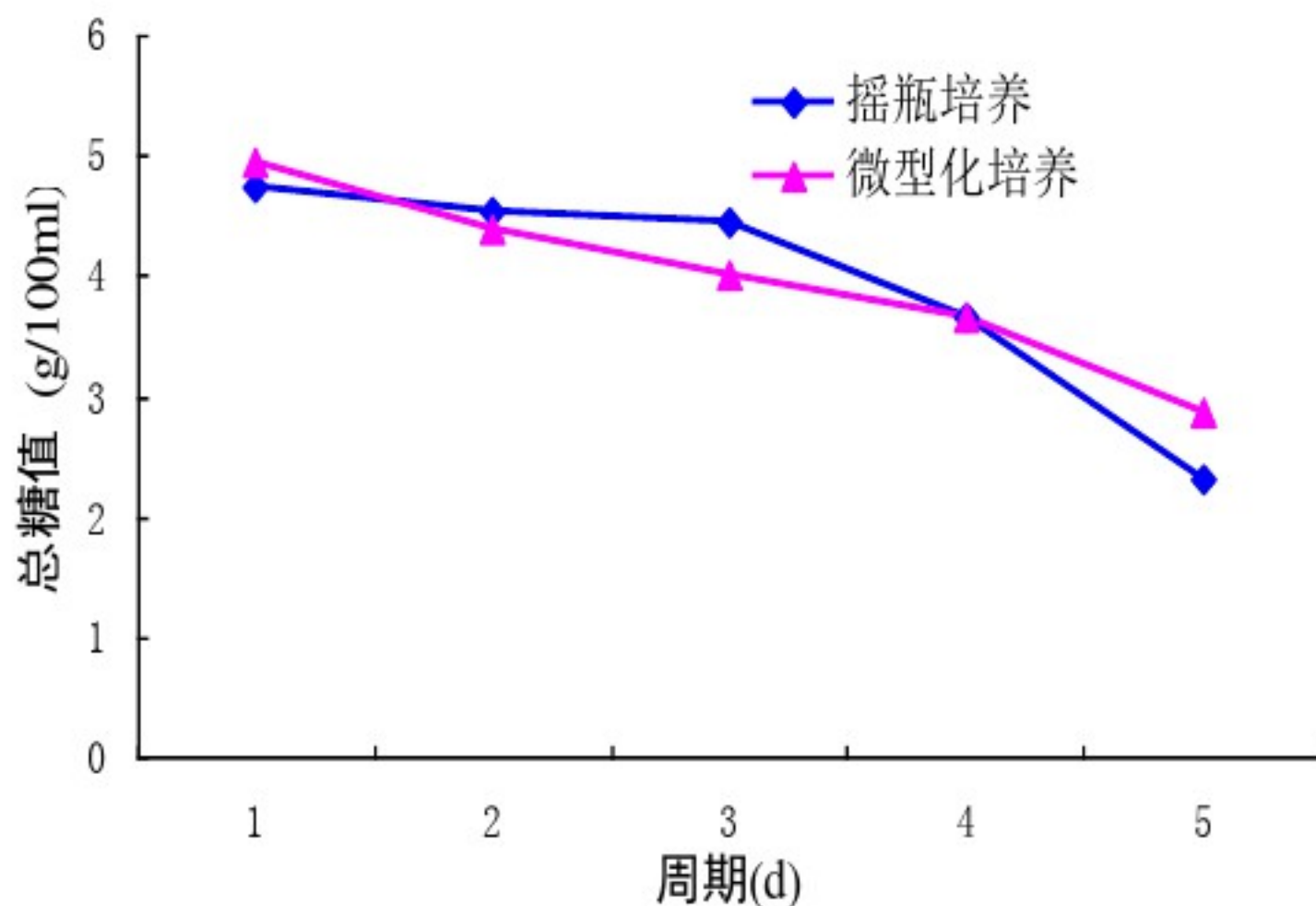
type of microtiter plate	well volume, dimension in horizontal plane	culture volume	orbital shaking frequency	shaking amplitude	O ₂ -transfer rate (30°C, air, 1 bar)	headspace refreshment rate ^{g)}	evaporation rate per well ^{g)} (at 30°C)	Mixing pattern at 300 rpm				
								ampl. 25 mm	ampl. 50 mm			
24-square deepwell polypropylene, 17x17 mm, depth 40 mm		2500 µl	300 rpm	50 mm	51 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	2.5 ml / min (1 VVM)	50% humidity: 50 µl H ₂ O per day					
		2500 µl	300 rpm	25 mm	39 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		2500 µl	220 rpm	50 mm	35 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	2.5 ml / min (0.6 VVM)	75% humidity: 25 µl H ₂ O per day					
		4000 µl	300 rpm	25 mm	24 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		4000 µl	220 rpm	50 mm	24 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
24-round lowwell polystyrene, Ø 16 mm, depth 18 mm		750 µl	300 rpm	50 mm	40 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	1.1 ml / min (1.4 VVM)	50% humidity: 30 µl H ₂ O per day					
		750 µl	300 rpm	25 mm	25 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		1000 µl	300 rpm	50 mm	30 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	1.1 ml / min (1.1 VVM)	75% humidity: 15 µl H ₂ O per day					
		1000 µl	300 rpm	25 mm	19 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
96-square deepwell polypropylene, 8x8 mm, depth 40 mm		500 µl	300 rpm	50 mm	38 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	1 ml / min (2 VVM)	50% humidity: 22 µl H ₂ O per day					
		500 µl	300 rpm	25 mm	12 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		750 µl	300 rpm	50 mm	24 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	1 ml / min (1.3VVM)				75% humidity: 11 µl H ₂ O per day		
		750 µl	300 rpm	25 mm	7 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		1000 µl	300 rpm	50 mm	18 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	1 ml / min (1 VVM)						
		1000 µl	300 rpm	25 mm	3 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
96-round lowwell polystyrene, Ø 6.5 mm, depth 11.4 mm		100 µl	300 rpm	50 mm	39 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	250 µl / min (2.5 VVM)	50% humidity: 6 µl H ₂ O per day					
		100 µl	300 rpm	25 mm	20 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		150 µl	300 rpm	50 mm	32 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	250 µl / min (1.7 VVM)				75% humidity: 3 µl H ₂ O per day		
		150 µl	300 rpm	25 mm	16 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							
		200 µl	220 rpm	50 mm	12 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}	250 µl / min (1.3 VVM)						
		200 µl	300 rpm	25 mm	12 mmol O ₂ /L.h ^{aj)}							

微型化培养-发酵参数比较

2.3 生物效价

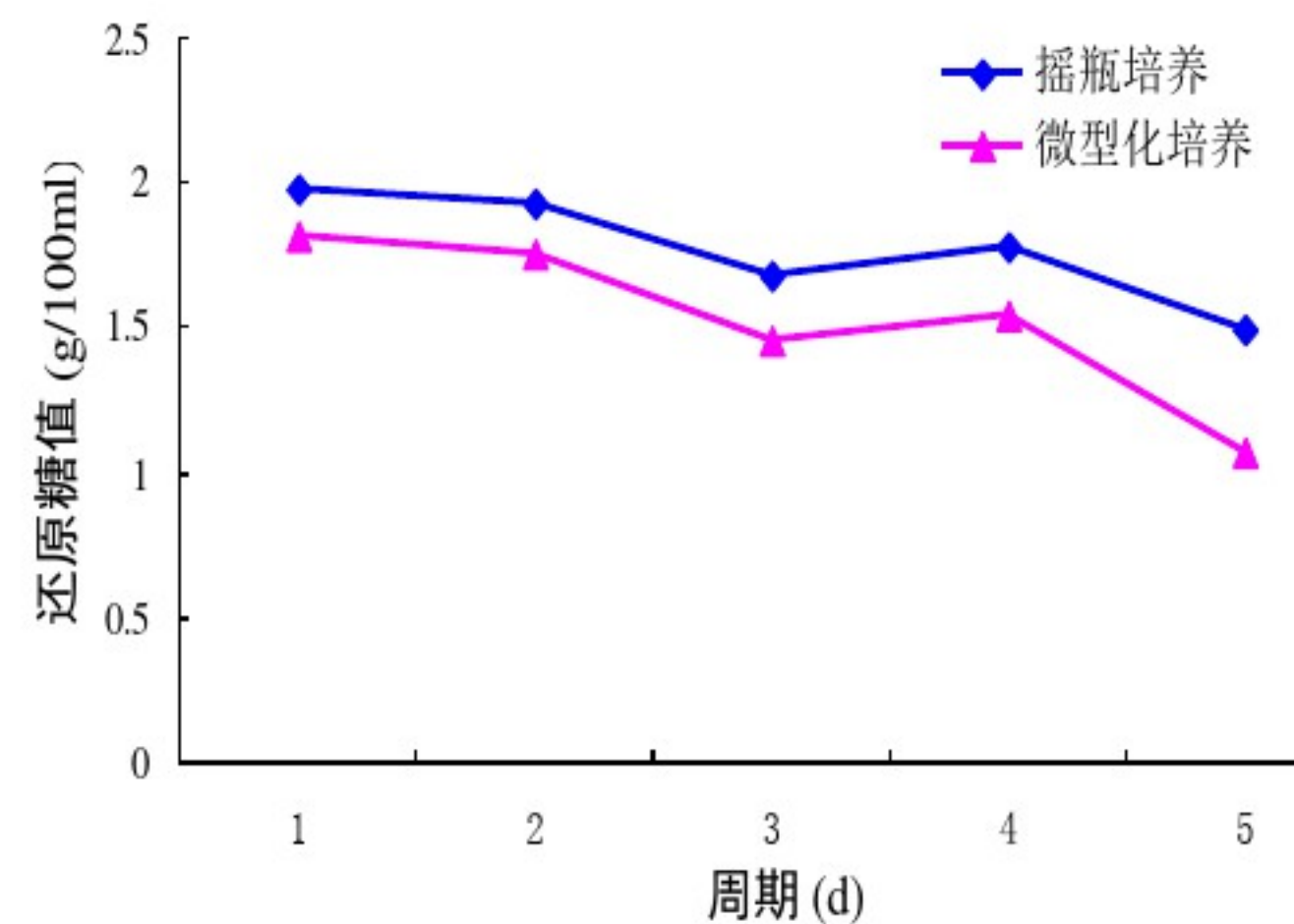


2.4 总糖的对应性实验

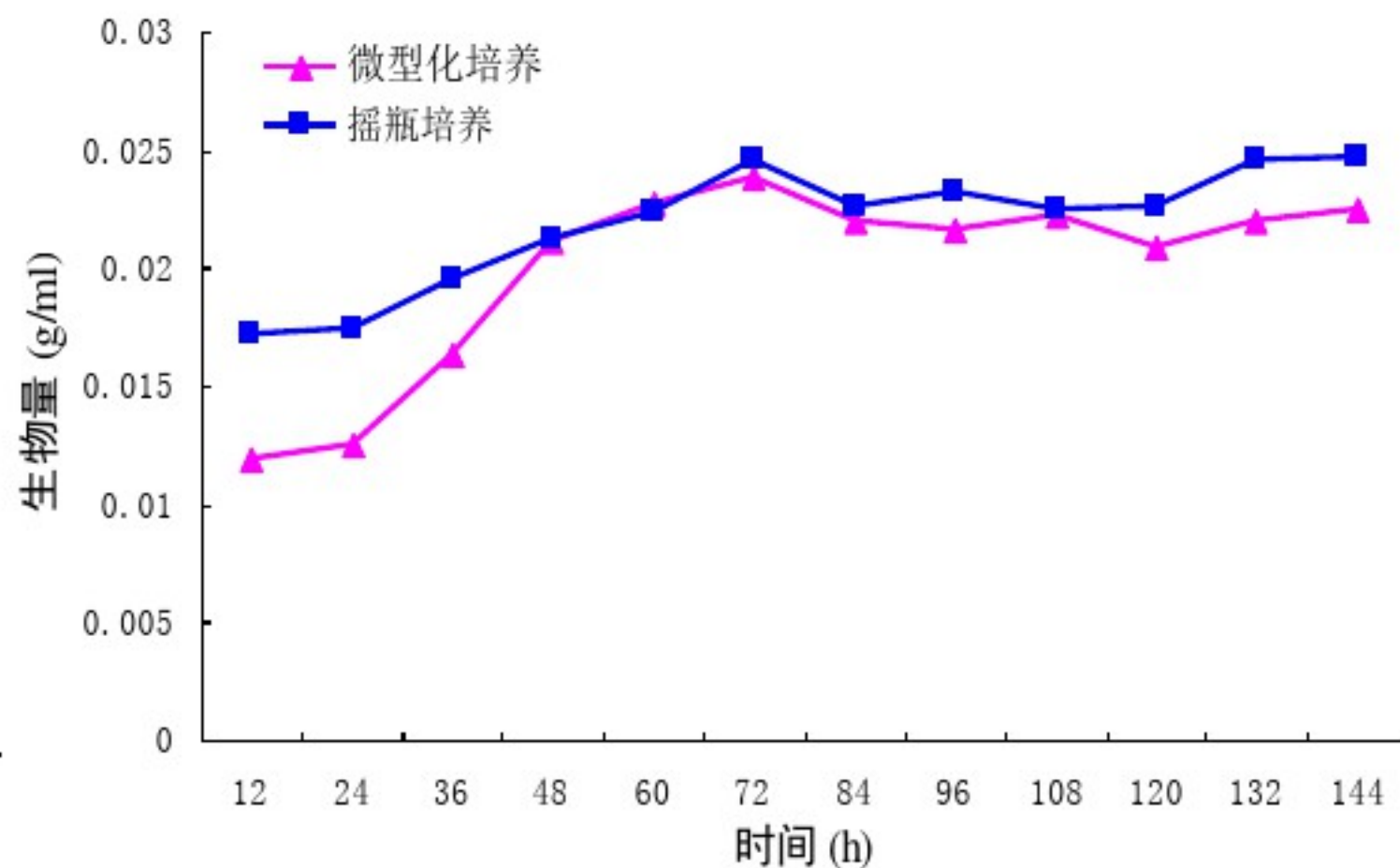


微型化培养-发酵参数比较

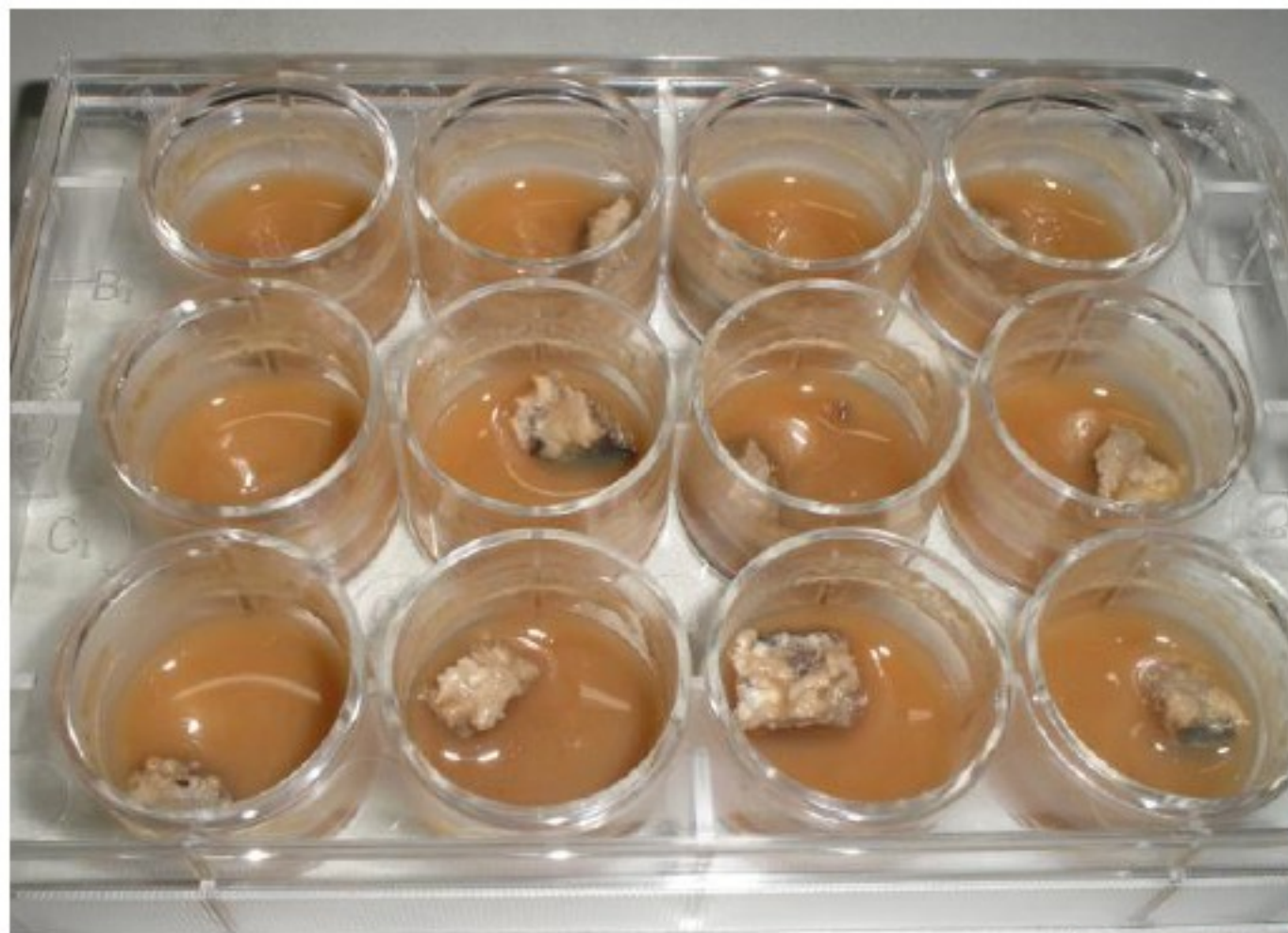
2.5 还原糖的对应性实验



2.6 生物量



微型化培养-装置图



种子（挖块）

发酵（孔径2cm）



- **建立与微型化发酵培养配套的检测方法，才能真正意义上实现筛选的高通量。**
- 生物检测法
- 化学检测法

红霉素检测方法

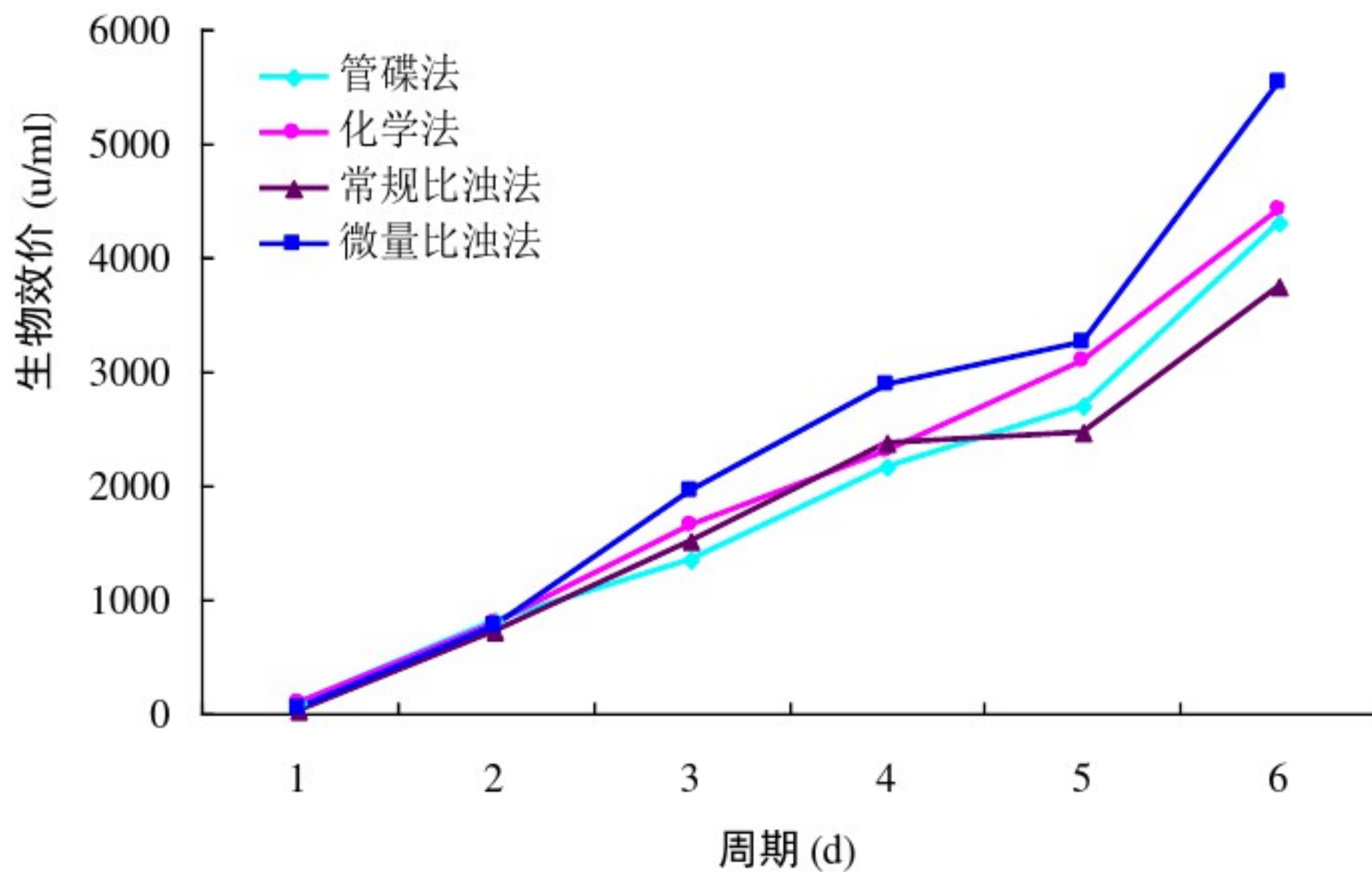
生物检测法

- 生物检定法又分管碟法和比浊法两种，管碟法是最常用的生物检定法，也是我国2005版之前药典收录的唯一一种微生物检定法。
- 与管碟法比较，比浊法具有快速(检验仅需3~4 h)、易于操作、采用液体培养法、无扩散因素影响、灵敏度高和精密度较好等优点，适用于绝大部分抗生素和含抗生素样品的含量测定。

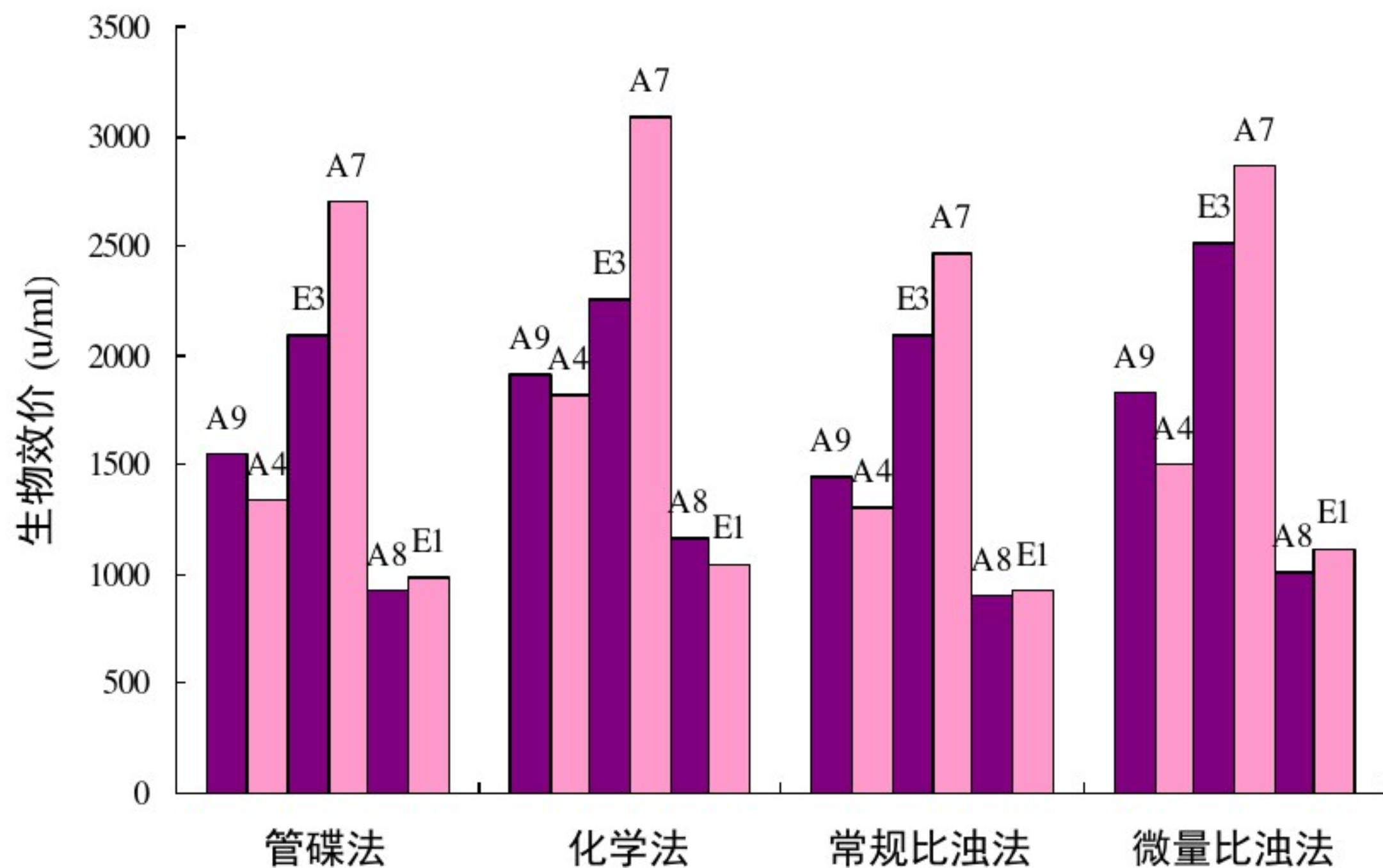
化学检测法

- 红霉素分子在酸性条件下水解生成黄色络合物，此颜色与含量成正比，符合朗格尔比色定律。

微量比浊法测定红霉素生物效价的可行性



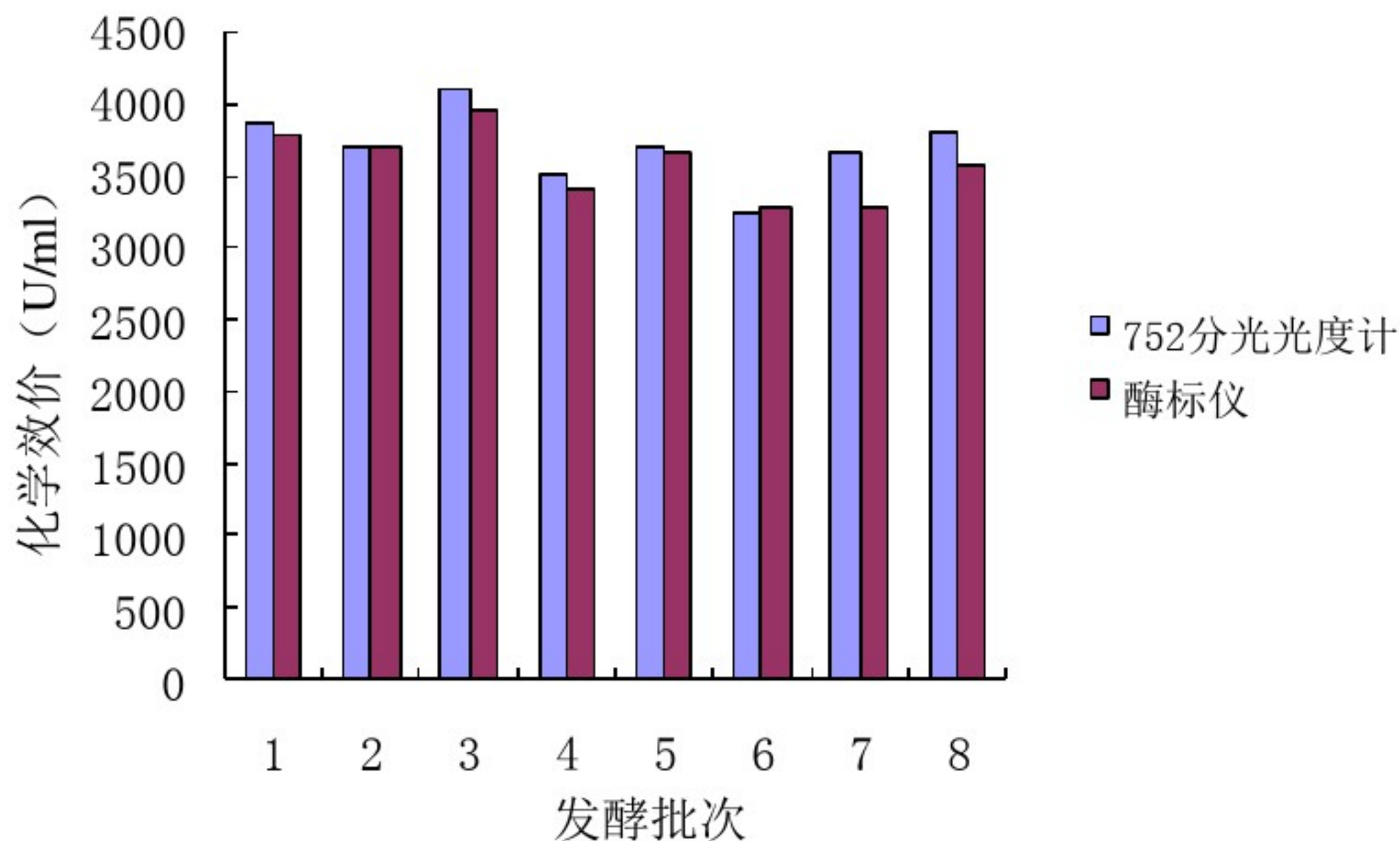
微型化分析-生物检测法



检验96孔板的准确度与精密度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.330	0.331	0.331	0.330	0.331	0.330	0.331	0.332	0.331	0.331	0.331	0.330
B	0.332	0.333	0.333	0.332	0.332	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.332	0.332
C	0.331	0.332	0.332	0.332	0.332	0.332	0.333	0.333	0.332	0.332	0.332	0.331
D	0.332	0.333	0.334	0.333	0.333	0.333	0.334	0.334	0.333	0.333	0.333	0.332
E	0.332	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.334	0.333	0.333	0.334	0.333	0.332
F	0.333	0.334	0.334	0.334	0.333	0.333	0.334	0.336	0.334	0.333	0.333	0.333
G	0.333	0.333	0.334	0.334	0.333	0.333	0.334	0.334	0.334	0.334	0.334	0.333
H	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333
准确度：1.5% 精密度：0.005 相对标准偏差(RSD)：1.48%												

红霉素化学效价测定结果比较



样品前处理对红霉素效价检测的影响分析

不同材料的反应介质对化学效价的影响

	聚丙烯管 (Polypropylene)	试管 (Tube)	相对标准偏差 (RSD)
吸光度	0.161	0.166	0.0216
化学效价	3916	4012	0.0171

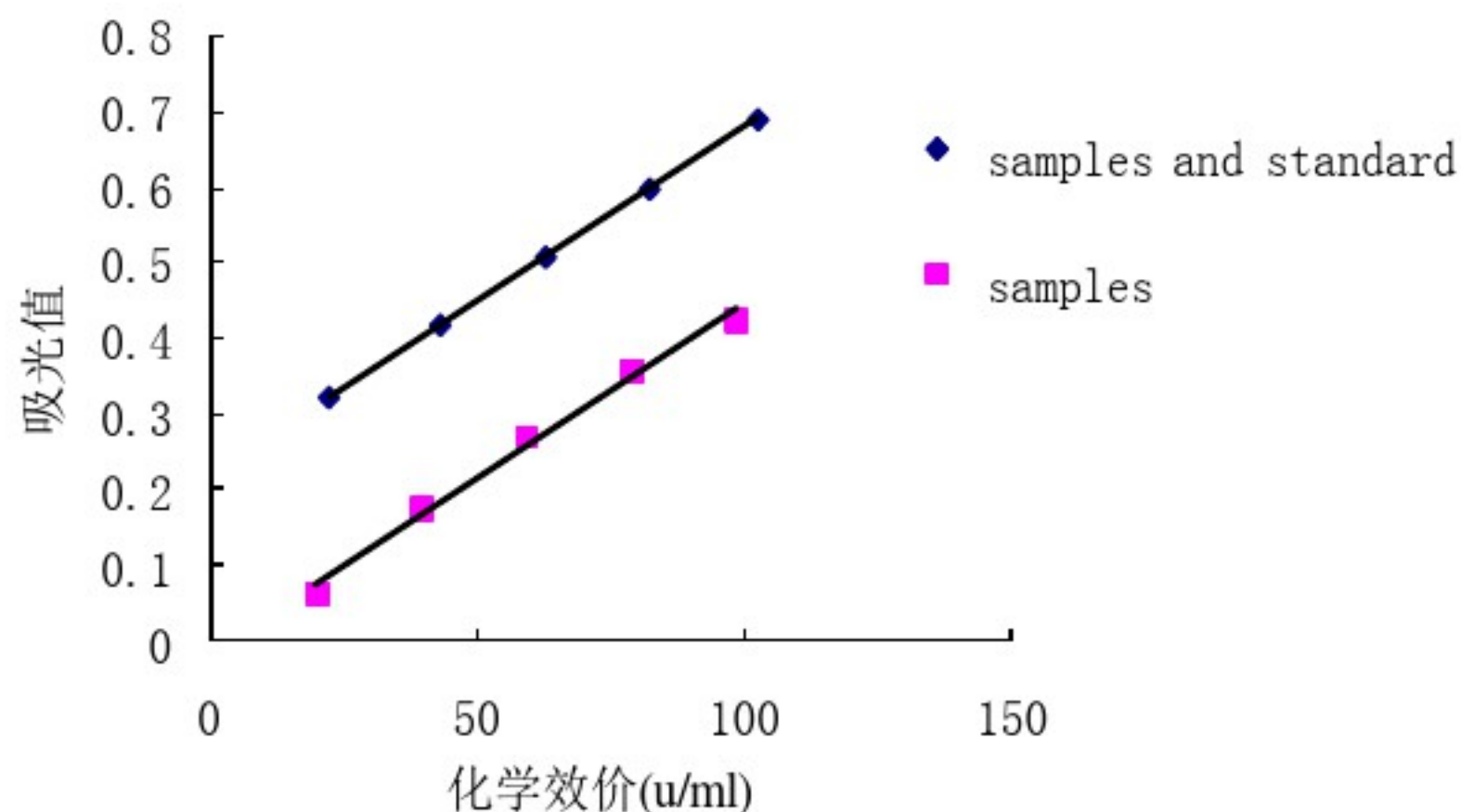
同一发酵液测量体积不同时的化学效价

	10 ml	5 ml	2.5 ml	1250 μl	500 μl	200 μl
吸光度	0.187	0.192	0.184	0.180	0.179	0.174
化学效价)	4967	5075	4902	4816	4794	4686
相对标准偏差	0.0282					

不同脱水剂对化学效价的影响

	分子筛 (Zeolite)	无水硫酸钠 (Na ₂ SO ₄)	相对标准偏差 (RSD)
吸光度	0.189	0.185	0.00768
化学效价	2783	2735	0.0123

高通量化学检测方法验证



$$Y1=0.0046X-0.0164$$

$$Y2=0.0046X+0.2202$$

标准品加入法是在样品溶液中加入一系列梯度标准溶液进行显色测定，然后按照绘制标准曲线的步骤测定吸光度，绘制吸光度-加入浓度曲线，用外推法求得样品溶液的浓度。两条直线切入横座标上所间的距离，即是样品中红霉素的化学效价，为47.8 μ /ml，标准曲线法测定的结果为48.02 μ /ml，相对标准偏差为0.00324

高通量（微型化）抗生素效价分析方法

生物效价高通量分析方法：

基于比浊法原理设计生物效价高通量分析方法，使分析时间从20多小时缩短到4小时，分析样品量从1ml降到10ul，鉴定菌培养基从30ml降到90ul，一次检测样品数量可达到成百上千份，而且仅需1人操作，传统生物效价分析，每天每人分析样品数量50份左右。☞

化学效价高通量分析方法：

开发了可以与自动化液体处理工作站相匹配的微量化化学分析路线，筛选通量更高，样品检测体积更小，反应体积从20ml降到500ul，检测体积从5ml降到100ul，分析时间更短，1小时之内完成上千份样品分析。☞



单菌落培养

高通量培养 技术

24孔



48孔



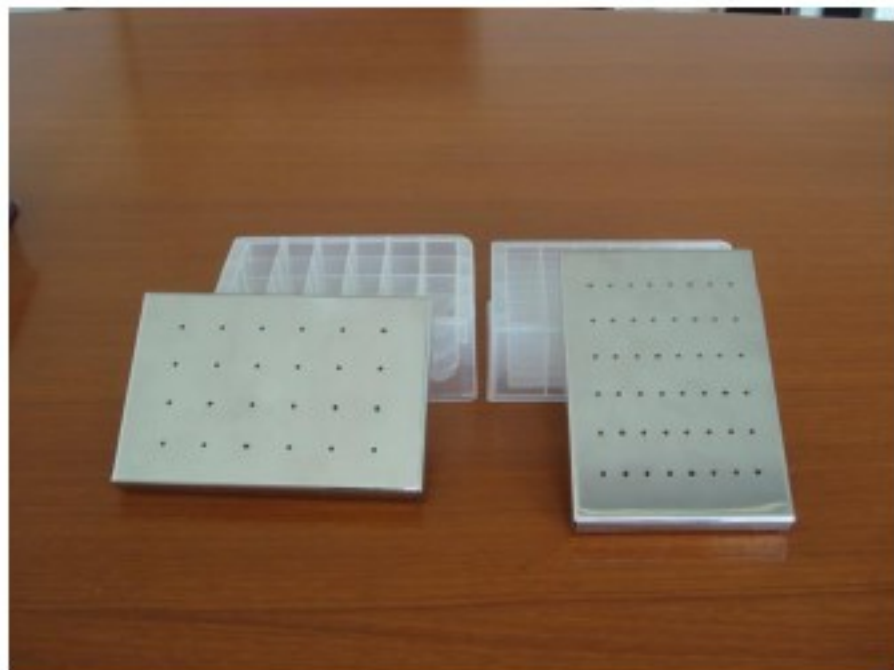
固体培养和菌种保藏



96孔



装液量：
500 — 2000 ul



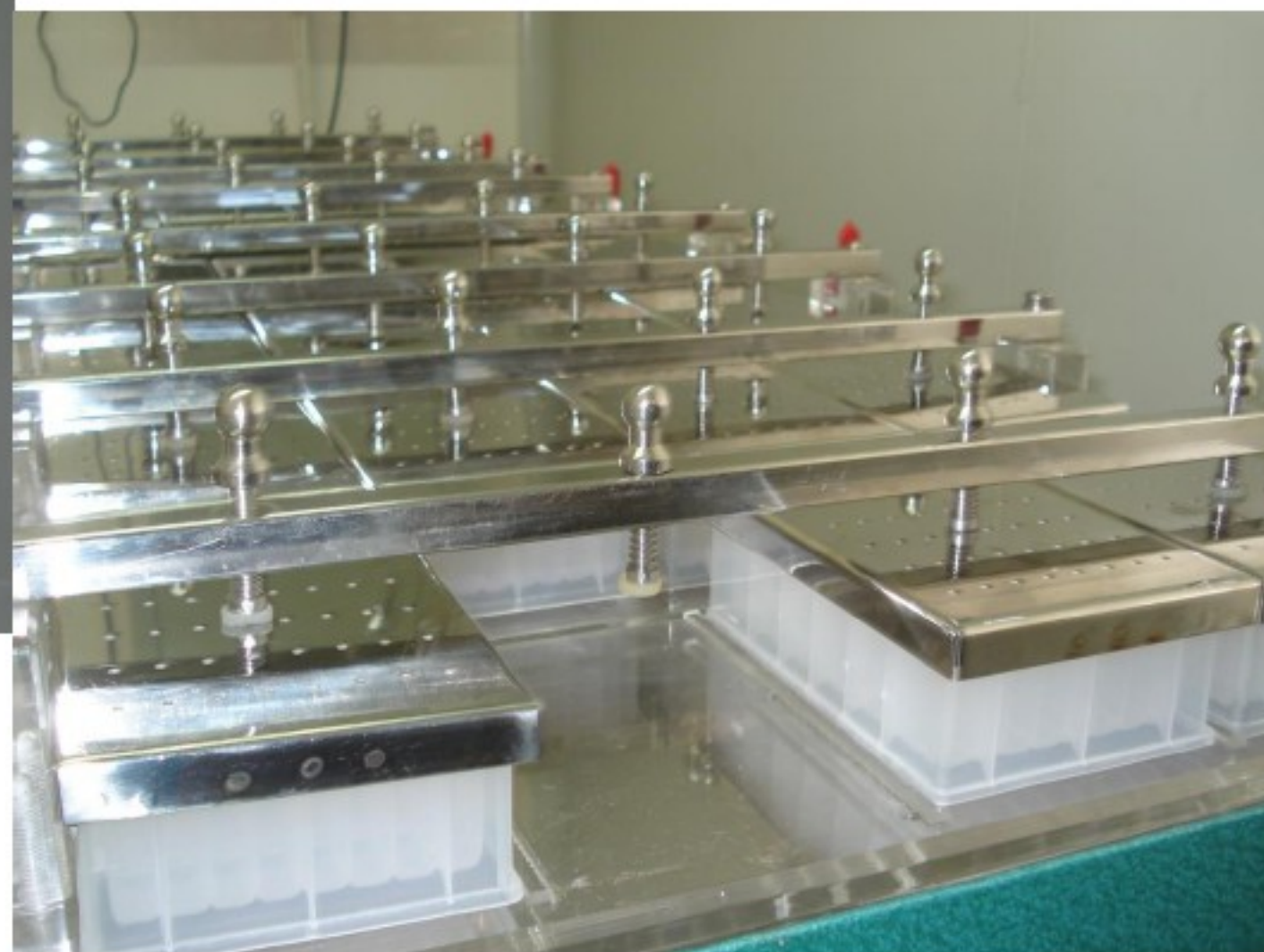
可灭菌、
重复使用寿命长、
成本低、
易清洗、
能统一标准、
防交叉污染、
透气性好、
防止水分蒸发

孔板盖





板数 : $8 \times 8 \times 2 = 128$

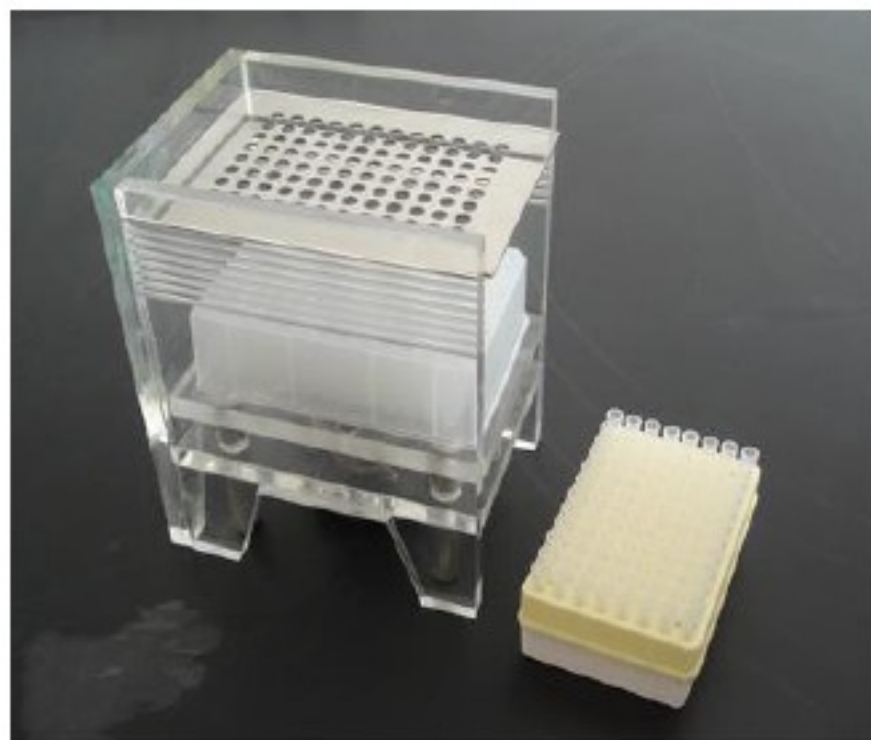


孔数 : $128 \times 24 = 3072$

$128 \times 48 = 6144$

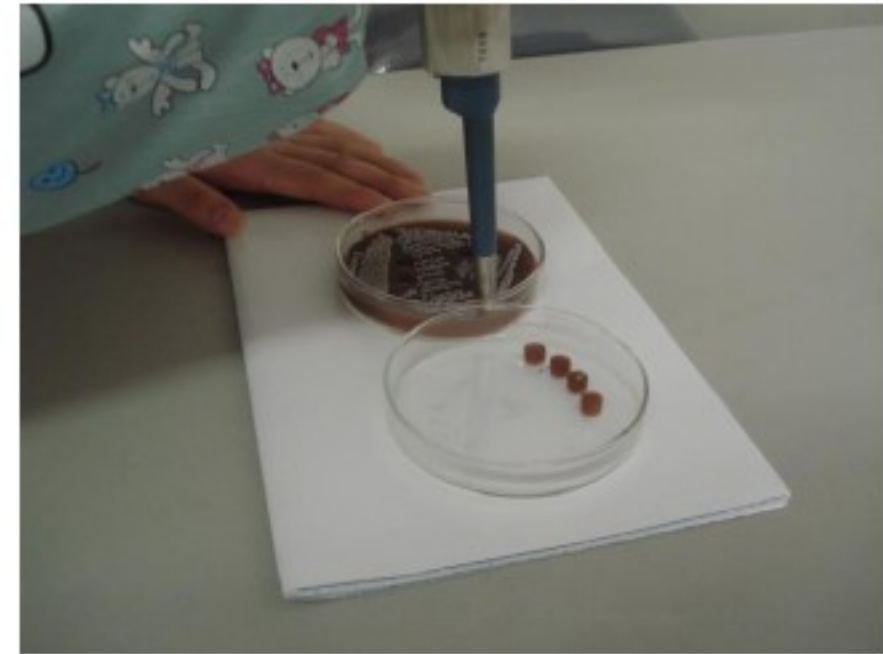
$128 \times 96 = 12288$

微孔板固定架



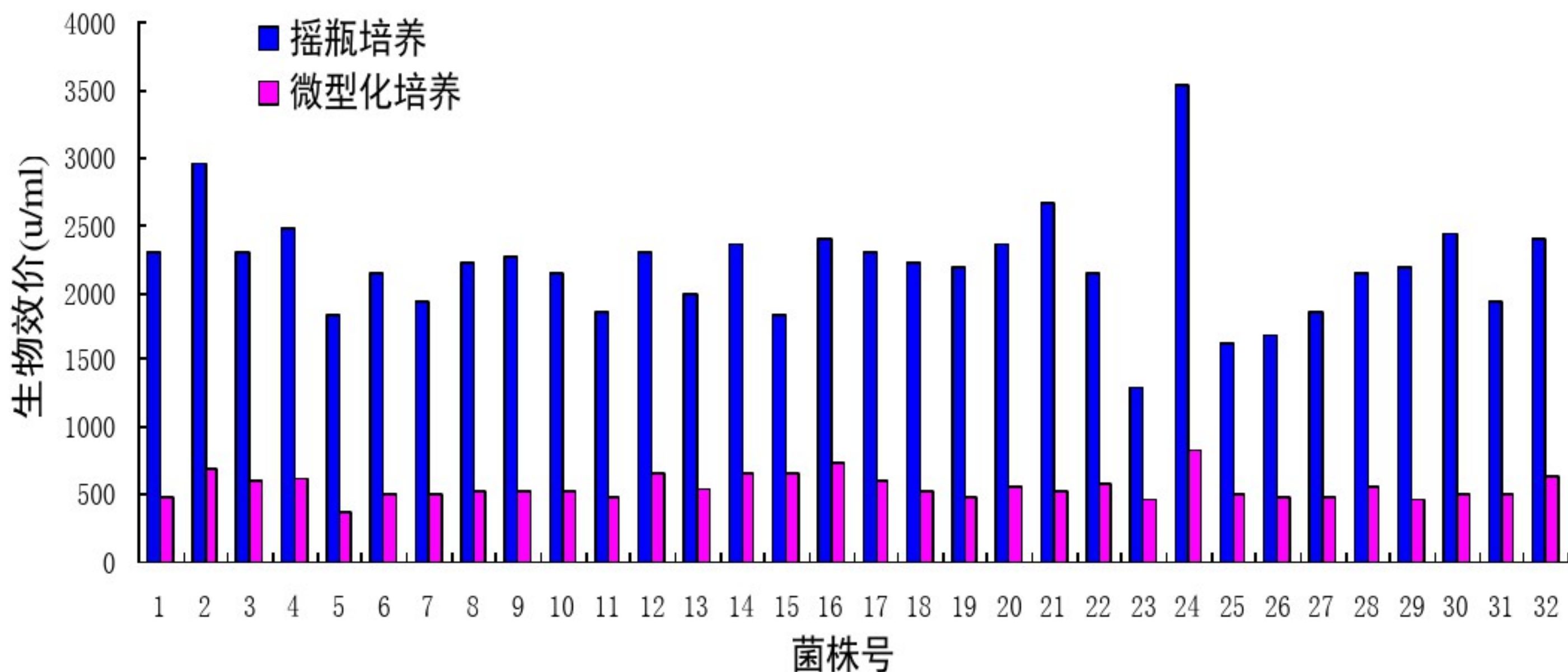
多通道可调深孔板取样适配器

专用菌落琼脂柱打孔器

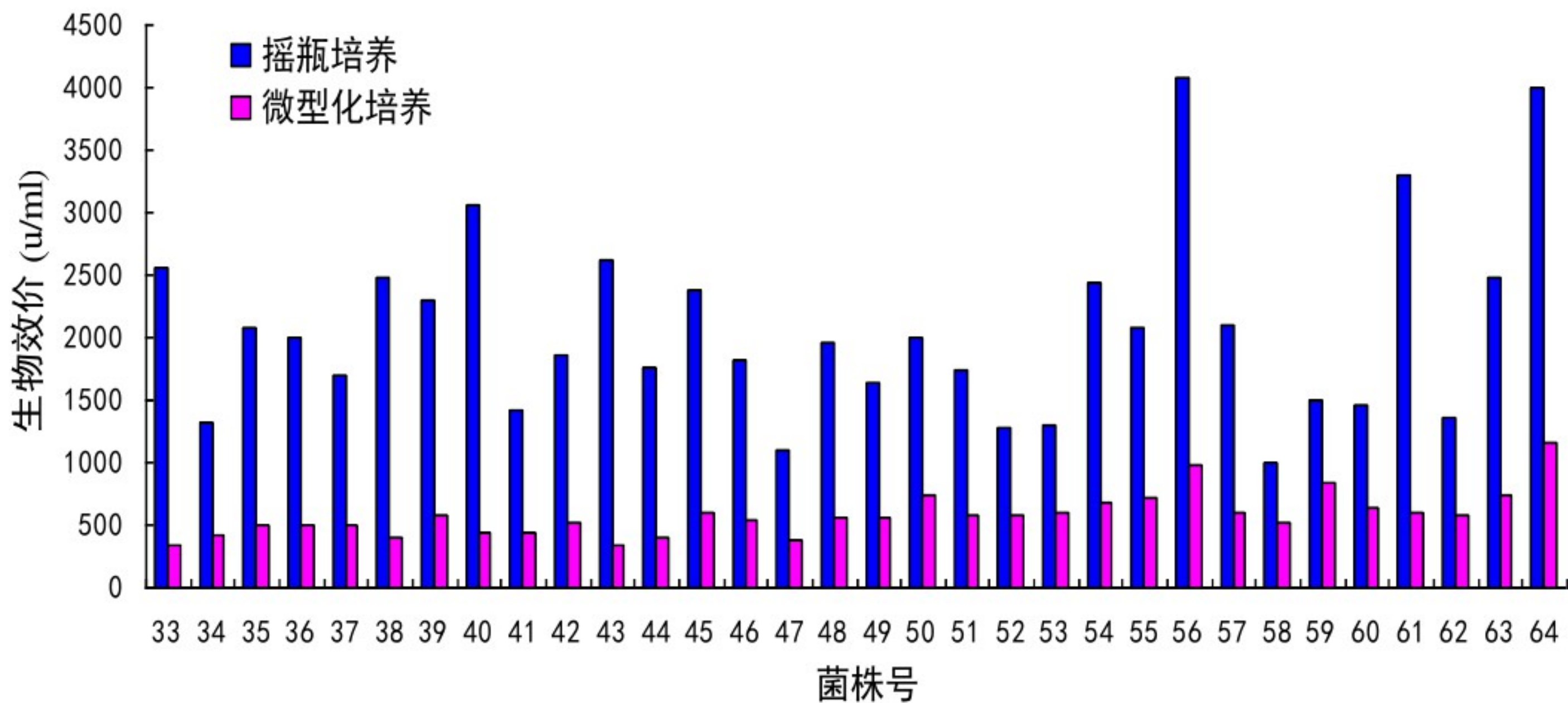


微型化平台应用

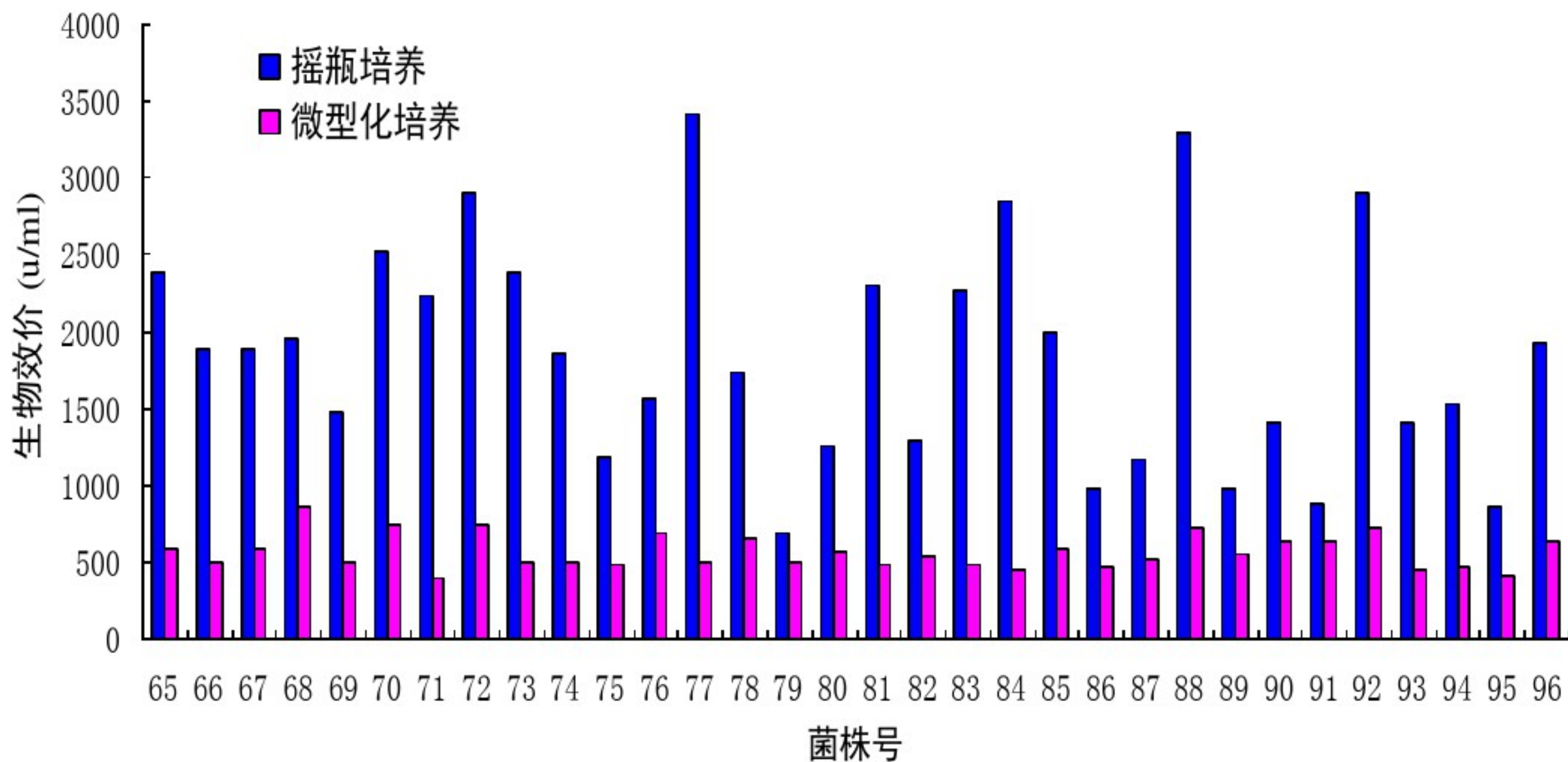
对诱变后96个菌株分别进行摇瓶培养和微型化培养，5天后测定其生物活性，结果如图。



微型化平台应用



微型化平台应用



总结：高通量筛选技术的优势 (1)

- 操作平行性
- 结果可比性
- 效率(一周到一个月完成常规方法一年的工作量)
- 成本：人力、时间、空间、经济

总结：高通量筛选技术的优势 (2)

1. 高产菌株的筛选

数量性状：1—多关系，无模型，依靠筛选数量

如：赖氨酸高产菌株筛选

质量性状：0—1关系，有模型，无需庞大筛选数量。

如：赖氨酸缺陷菌株筛选

- 其他：各种氨基酸、有机酸、维生素、抗生素、生物基产品等高产筛选

总结：高通量筛选技术的优势 (3)

2. 发酵原材料（培养基）的生物检验

- ① 直接检验原材料的应用效果
- ② 精细调节原材料的配比和用量
- ③ 不同原材料与菌株的对应关系

- 特点：建立原材料数据库和菌株数据库
长期性、基础性工作



谢谢！

